Mécanismes et impact de l'activité physique et de la sédentarité sur les facteurs de risque biologiques de l'instabilité de plaque d'athérosclérose carotidienne

Pauline Mury

▶ **To cite this version:**

Pauline Mury. Mécanismes et impact de l'activité physique et de la sédentarité sur les facteurs de risque biologiques de l'instabilité de plaque d'athérosclérose carotidienne. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1067 . tel-01878197

HAL Id: tel-01878197
https://theses.hal.science/tel-01878197

Submitted on 20 Sep 2018

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.

N°d'ordre NNT : 2018LYSE1067

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie, Biologie, Santé
Discipline : Physiologie

Soutenue publiquement le 02/05/2018, par :
Pauline MURY

Mécanismes et impact de l'activité physique et de la sédentarité sur les facteurs de risque biologiques de l'instabilité de plaque d'athérosclérose carotidienne

---

Devant le jury composé de :

Rapporteurs
Mr FLORE Patrice, Maître de conférences, Habilité à diriger des recherches – Université Grenoble Alpes
Mme VINET-JULLIAN Agnès, Professeure d'Université – Université d'Avignon

Examinateurs
Mme ARNAUD Claire, Chargée de Recherche – Université Grenoble Alpes
Mr RIOUFOL Gilles, Professeur – Université Claude Bernard Lyon 1

Directeur/Co-directeur de thèse
M. PIALOUX Vincent, Professeur d'Université – Université Claude Bernard Lyon 1
M. MILLON Antoine, Professeur d'Université Praticien Hospitalier – Université Claude Bernard Lyon 1

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G. RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y. VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E. PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je souhaite remercier, dans un premier temps, l'ensemble des membres du jury, Pr Agnès VINET*, Dr* Patrice FLORE*, Dr* Claire ARNAUD*, Pr* Gilles RIOUFOL*, Pr* Antoine MILLON *et Pr* Vincent PIALOUX *pour avoir accepté de lire et juger ce travail de thèse.*

Je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur de thèse Vincent PIALOUX *pour m'avoir fait confiance il y a maintenant plus de 5 ans. Merci de m'avoir proposé cette thèse et m'avoir fait découvrir la recherche dans la bonne ambiance qui caractérise cette équipe. Tu m'as toujours encouragé et soutenu dans les moments un peu plus compliqués, tu m'as permis de prendre confiance en moi professionnellement et de plus m'ouvrir aux autres. Merci aussi pour m'avoir permis de faire ce petit passage aux US, qui a été une superbe expérience pour moi, aux niveaux professionnel et personnel, et également pour l'anglais (et c'était pas gagné !). Merci pour tout, et j'espère que notre collaboration va continuer encore longtemps.*

Un grand merci également à Antoine MILLON*, mon co-directeur de thèse. Je te remercie tout d'abord, pour m'avoir permis de découvrir le monde de l'hôpital et des blocs opératoires (même si ça n'a pas toujours été simple). Merci également pour m'avoir permis de m'envoler quelques mois à New York, c'était un de mes rêves d'habiter là bas. Ça a été une expérience très enrichissante. Je te remercie aussi pour ta gentillesse et ta sympathie même quand je te harcèle de messages ! Comme pour Vincent, j'espère que l'on va pouvoir continuer à travailler ensemble dans l'avenir.*

Une pensée particulière aussi pour Philippe CONNES*. Merci Phil pour le temps que tu as passé à m'expliquer ta science de l'hémorhéologie, corriger les papiers et ma thèse, mais surtout pour ta disponibilité et tes conseils avisés dans n'importe quel domaine. Je ne sais pas, par contre, si je te remercie pour les stats ? et pour tes blagues ? Non évidemment tu participes pleinement à la bonne humeur qui règne dans cette équipe, et merci pour ton investissement dans les évènements d'équipe, qui ont tous été des moments top passés tous ensemble. J'en profite aussi pour remercier l'ensemble de l'équipe VBRBC du LIBM pour leur accueil et leur sympathie au quotidien (*Cyril*,* Christophe*,* Philippe Joly*,* Camille*,* Céline*,* Romain*,* Emeric*).*

Evidemment, j'adresse aussi un grand merci à Chiara GIANNARELLI *pour m'avoir accueilli dans son équipe. Thank you so much Chiara for gaving me the chance to come to New York in one of the greatest hospital of the US. This travel was a really great experience for me and gave me another vision of the research. I learnt a lot during these 6 months. A special thank-you to* Letizia*, for everything in reality, for taking the time to teach me a lot about experiments, for your experience of science, for your patience with me and your happiness, and obviously for all the time we spoke about gossip! I also think to* Payal *even if we didn't share the office so long, but thank you for your happiness, the bolliwood flashmob in Times Square (nice memory), and the Indian spiced food! Before to close the chapter of New-York, I would like to thank the best roommate of this flat,* Iris*. You were my best meeting of this trip, thank you for all the english-french-spanish discussions we had (often hard to follow ahah), for the gym trainings, for sharing dinners and the living room and for your humor. I'm glad that we succeed to stay in touch despite the distance and I'm sure it will be like that for long time whatever we will live!*

Je souhaite remercier ensuite l'ensemble de l'équipe du bloc opératoire *du département de chirurgie vasculaire de l'hôpital Edouard Herriot pour m'avoir accepté et permis d'entrer dans le bloc et de récupérer les échantillons biologiques des patients opérés de la carotide. Merci aux chirurgiens, anesthésistes, infirmiers, aides-soignants sans qui je n'aurai pas pu réaliser mes expérimentations. Je*

pense particulièrement à Agnès qui a toujours été bienveillante avec moi, et Dominique pour m'avoir expliqué tant de chose sur son métier d'infirmière anesthésiste et m'avoir guidé pendant les quelques opérations auxquelles j'ai pu assister.

Je remercie dans le même temps l'équipe du Dr Philippe JOLY du Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Céline biensur mais aussi Caroline, Joëlle, Martine, Philippe pour votre accueil, votre gentillesse, et les pauses thés tous ces matins où je venais utiliser vos centri et le LORRCA. Merci beaucoup Céline pour ta patience, ton humour et tous les coups de main que tu m'as toujours filé avec le sourire avec ce foutu LORRCA.

Je tiens également à remercier l'équipe 2 « Régulations de la masse musculaire et désordres métaboliques » du laboratoire CarMen, dirigée par le Dr Etienne LEFAI pour m'avoir accueilli pendant près de 2 mois pour la réalisation des coupes histologiques de plaques d'athérome. Je tiens, plus particulièrement à remercier la team histologie Stéphanie CHANON et Aurélie VIEILLE-MARCHISET pour m'avoir appris, conseillé et même remplacé pour mes quelques 3000 coupes. Merci de votre accueil à toutes les 2, et de votre gentillesse tout au long de ces 2 mois.

Enfin, je remercie l'équipe du Dr Bénédicte CHAZAUD de l'Institut NeuroMyoGène pour leur accueil, leur expertise et leur aide précieuse dans la réalisation de ma dernière étude de thèse. Merci à Bénédicte et plus particulièrement Michèle pour son aide et ses conseils. Je remercie aussi l'ensemble des doctorants (Laure, Thibaut, Jimmy, Jessica) pour leurs petits coups de main et leur gentillesse.

Je remercie aussi mes chers collègues doctorants sans qui je n'aurai pas pu passer d'aussi bonnes années au sein de ce laboratoire : Manue, Sarah et Elie, la « team physio ». Un grand merci à vous 3, j'ai trouvé en vous plus que des collègues mais des amis. Merci de m'écouter râler sans jamais en avoir marre, pour les potins, de plus en plus présents, merci pour les séminaires/congrès/repas, pour nos apéros, et merci de faire en sorte que les journées soient cool ! Mention spéciale pour Manue qui m'a supporté le plus longtemps. Merci pour ton aide précieuse à chaque étape de ma thèse, pour ton écoute et pour avoir animé mes journées pendant ces 5 ans à Lyon. Merci aussi à Elodie, Thiago, Paul, Gonzalo, Noémie, Lidia, Mathilde, Amandine pour tous les bons moments passés tous ensemble, que ce soient les soirées doctorants ou les congrès, ça a été un plaisir de passer ces quelques années à vos côtés. Je vous souhaite à tous de bien finir votre thèse.

Enfin, merci à ma famille et mes amis, qui de près ou de loin m'ont soutenu pendant ces dernières années d'étude, et aidé des fois sans le savoir à décrocher un peu du boulot. D'abord merci à mes parents et ma sœur qui ont toujours cru en moi, et m'ont toujours soutenu à chaque étape de cette thèse. Merci à Violaine, pour tous ces moments à parler « boulot » qui ont toujours été libérateurs pour moi, tous tes bons conseils, et nos soirées bières/jeux avec Océ et les autres. Merci à Raph, t'as toujours été là pour moi (même quand t'étais loin), merci pour toutes ces soirées, et plus sérieusement pour tes conseils et ton soutien ! Merci aussi à Méliss, je suis contente que tu sois venue à Lyon, ça nous a rapprochées et merci de t'être toujours intéressée à mon boulot, ça compte pour moi.

Merci beaucoup à vous tous, c'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui !!!

TABLE DES MATIERES

Liste des figures du manuscrit 8
Liste des tableaux du manuscrit 9
Liste des abréviations 10
PARTIE 1 – AVANT-PROPOS 14
PARTIE 2 – REVUE DE LITTÉRATURE 18
Chapitre 1 : L'athérosclérose, maladie cardiovasculaire complexe et problème majeur de santé publique 19
A. GÉNÉRALITÉS 19
1. Historique de la pathologie 19
2. Données épidémiologiques 20
3. Définition de l'athérosclérose 22
a. Définition brève 22
b. Composition de la paroi vasculaire 22
4. Facteurs de risque modifiables et non-modifiables 24
a. Facteurs de risque non-modifiables 24
b. Facteurs de risque modifiables 27
B. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ATHÉROSCLÉROSE 31
1. Développement de la pathologie : l'athérogénèse 31
2. Progression et évolution de la lésion compliquée 34
3. Complications cliniques 38
4. Risque de l'Activité Physique aigue 39
C. L'ACCIDENT VASCULAIRE CÉRÉBRAL 42
1. Définition 42
2. Examens diagnostics et traitements actuels 44
a. Examens diagnostics 44
b. Traitement chirurgical 47
c. Traitement médicamenteux 50
d. Traitement par l'Activité Physique 55
Chapitre 2 : Mécanismes d'instabilité/vulnérabilité et de rupture de la plaque d'athérosclérose carotidienne 59
1. Chape fibreuse 59
2. Cœur nécrotique riche en lipides 60
3. Hémorragie intraplaque 61
4. Néovascularisation 62
5. Contraintes de cisaillement (ou shear stress) 64
Chapitre 3 : Stress oxydant et processus inflammatoires : rôle dans l'athérogénèse 65
A. STRESS OXYDANT 65
1. Définition : balance pro/antioxydants 65
2. Pro-oxydants 66
a. Espèces réactives de l'oxygène 66
b. Sources de ROS 66
c. Marqueurs du stress oxydant dans l'athérosclérose 70

3. Défenses antioxydantes 72
a. Antioxydants non-enzymatiques 72
b. Antioxydants enzymatiques 74
c. Antioxydants enzymatiques dans l'athérosclérose 75
4. Rôle global du stress oxydant dans l'athérogénèse 77

B. IMMUNITÉ INNÉE 80
1. Définition : rôle et acteurs 80
2. Sous-populations de monocytes et macrophages 83
a. Sous-population de monocytes 83
b. Sous-population des macrophages 85
3. Rôle global des monocytes/macrophages dans l'athérogénèse 86

C. MOLÉCULES INFLAMMATOIRES 87
1. Définition 87
2. Molécules pro-inflammatoires impliquées dans l'athérosclérose 89
3. Molécules anti-inflammatoires impliquées dans l'athérosclérose 91
4. Rôle global des molécules pro- et anti-inflammatoires dans l'athérogénèse 92

D. LIENS ENTRE LE STRESS OXYDANT, L'IMMUNITÉ INNÉE, L'INFLAMMATION ET L'INSTABILITÉ DE LA PLAQUE 94

Chapitre 4 : Implication de l'hémorhéologie dans le contexte de l'athérosclérose 97
1. Définition générale de l'hémorhéologie et de ses principaux paramètres 97
a. Viscosité sanguine 98
b. Déformabilité des globules rouges 100
c. Agrégation des globules rouges 101
2. Évolution des paramètres hémorhéologiques dans le contexte de l'athérosclérose 102
a. Viscosité sanguine 103
b. Déformabilité des globules rouges 105
c. Agrégation des globules rouges 105

Chapitre 5 : Effets du niveau d'activité sur les paramètres biologiques de l'athérosclérose 107

A. ACTIVITÉ PHYSIQUE 107
1. Effets sur le stress oxydant et l'inflammation 108
2. Effets sur les paramètres hémorhéologiques 110
3. Effets sur les biomarqueurs d'instabilité de la plaque 112

B. SÉDENTARITÉ 115
1. Effets sur le stress oxydant et l'inflammation 117
2. Effets sur les paramètres hémorhéologiques 118
3. Effets sur les biomarqueurs d'instabilité de la plaque 118

PARTIE 3 – Contribution personnelle 121

Objectifs et hypothèses de travail 122

Étude 1 : L'activité physique régulière réduit la prévalence de l'hémorragie intraplaque de plaque d'athérosclérose carotidienne asymptomatique 127

Étude 2 : Les dérégulations immunitaires à l'origine de l'inflammation chronique dans l'athérosclérose sont favorisées par la cytokine pro-inflammatoire CCL5 160

Étude 3 : Effets de l'activité physique et de la sédentarité sur le phénotype pro- ou anti-inflammatoire des monocytes circulants chez le patient à risque d'AVC 200

Étude 4 : L'activité physique améliore le profil hémorhéologique par une diminution de l'agrégation érythrocytaire chez des patients à risque d'AVC *222*

PARTIE 4 – CONCLUSION ET PERSPECTIVES *234*

Conclusion Générale *235*

Perspectives *238*

PARTIE 5 – BIBLIOGRAPHIE *241*

PARTIE 6 – VALORISATIONS *285*

A. PUBLICATIONS 287

1. Articles indexés dans PubMed 287
2. Articles soumis 288
3. Articles en rédaction 288

B. COMMUNICATIONS 289

1. Communications affichées 289
2. Communications orales 290

PARTIE 7 – ANNEXES *291*

LISTE DES FIGURES DU MANUSCRIT

Figure 1. Importance des maladies cardiovasculaires en France 20
Figure 2. Structure de la paroi artérielle 23
Figure 3. Diagramme estimant le risque d'un premier évènement atherosclérotique fatal sur 10 ans 25
Figure 4. Mortalité cardiovasculaire en fonction de l'âge et du sexe 26
Figure 5. Effets de l'ensemble des facteurs de risque et des facteurs protecteurs de l'athérosclérose 27
Figure 6. Effet du taux de cholestérol total sur l'incidence de la maladie coronarienne 30
Figure 7. Phénomène de diapédèse leucocytaire faisant intervenir les phases de capture, d'adhérence labile et de roulement, d'adhérence forte et de transmigration. 32
Figure 8. Classification histopathologique des lésions athérosclérotiques 34
Figure 9. Remodelage vasculaire compensateur 35
Figure 10. Formation de la plaque d'athérosclérose : vue générale et détail des étapes. 37
Figure 11. Manifestations cliniques de l'athérosclérose en fonction du territoire vasculaire touché 39
Figure 12. Classification des différents types d'AVC 43
Figure 13. Exemple d'images d'échodoppler (A), d'angioscanner (B) et d'angio-IRM (C) carotidiens 46
Figure 14. Procédure chirurgicale d'angioplastie avec pose de stent 48
Figure 15. Etapes de la chirurgie d'endartériectomie, selon les deux approches majeures 49
Figure 16. Plaque d'athérosclérose carotidienne avancée présentant une chape fibreuse fine (CF) et un cœur nécrotique riche en lipides large (LR/NC) 60
Figure 17. Plaque d'athérosclérose carotidienne avancée présentant une sténose serrée (> 90%), un cœur nécrotique riche en lipides large (LR/NC) et une hémorragie intraplaque importante (IPH) 62
Figure 18. Facteurs d'instabilité/vulnérabilité de la plaque d'athérosclérose 63
Figure 19. Sources des ROS endogènes et formation des différents types de radicaux libres 68
Figure 20. Découplage de la NO Synthase endothéliale conduisant à la formation de ROS 70
Figure 21. Action synergique des antioxydants non-enzymatiques 74
Figure 22. Interactions des enzymes antioxydantes 75
Figure 23. Rôle du stress oxydant et de l'inflammation dans l'initiation de l'athérogénèse 78
Figure 24. Rôle du stress oxydant, de l'inflammation et du métabolisme du NO dans l'initiation de l'athérogénèse 79
Figure 25. Principales cellules du système d'immunité innée 83
Figure 26. Cercle vicieux de l'instabilité de la plaque d'athérosclérose 96
Figure 27. Effets de la déformabilité et de l'agrégation érythrocytaire sur la viscosité sanguine en fonction de la vitesse de cisaillement 99
Figure 28. Influence de la contrainte de cisaillement sur le développement de l'athérosclérose 103
Figure 29. Profils d'activités quotidiennes découlant de données d'accéléromètres (profils d'une personne respectant les recommandations d'AP, d'une personne sédentaire, et d'une personne entrecoupant son temps de sédentarité) 116
Figure 30. Potentiels effets de l'activité physique et de la sédentarité sur les paramètres physiopathologiques de l'instabilité de plaque d'athérosclérose carotidienne 126

Figure 31. Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans les 4 études portant sur l'effet de l'activité physique et la sédentarité sur les facteurs d'instabilité de la plaque d'athérosclérose carotidienne _____ *238*

LISTE DES TABLEAUX DU MANUSCRIT

Tableau 1. Stratification du risque pour quantifier le pronostic d'un patient atteint d'une hypertension artérielle *29*
Tableau 2. Définition des principaux facteurs de risque cardiovasculaires *44*

LISTE DES ABREVIATIONS

- A -

AAP : Antiagrégant plaquettaire

ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine

ACEis : Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AIC : Accident ischémique constitué

AIT : Accident ischémique transitoire

AMP : Adénosine monophosphate

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

AOMI : Artériopathie oblitérante des membres inférieurs

AOPP : Produits avancés de l'oxydation des protéines

AP : Activité physique

ApoB (C ou E) : Apolipoprotéine B (C ou E)

ARB : Bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II

ATP : Adénosine triphosphate

AVC : Accident vasculaire cérébral

- C -

CCB : Bloqueurs des canaux calciques

CD : Clusters de différenciation

CHD : Maladie cardiaque coronarienne

cIMT : Carotid intima-media thickness

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CML : Cellules musculaires lisses

CRP : Protéine c-réactive

CV : Cardiovasculaire

- E -

ECG : Électrocardiogramme

ECST-2 : European Carotid Surgery Trial 2

EPO : Érythropoïétine

- $\mathcal{F}$ -

FC max : Fréquence cardiaque maximale

FMD : Vasodilatation dépendante du flux sanguin

- $\mathcal{G}$ -

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

GR : Globule rouge

- $\mathcal{H}$ -

HAS : Haute Autorité de Santé

Hct : Hématocrite

HDL : Lipoprotéines de haute densité

HDL-C : Lipoprotéines de haute densité - cholestérol

HIF-1α : Facteur induit par l'hypoxie

HTA : Hypertension artérielle

- $\mathcal{I}$ -

ICAM : Molécule d'adhérence intercellulaire

IFN-γ : Interféron gamma

IL-1 : Interleukine 1

IM : Infarctus du myocarde

IMC : Indice de masse corporelle

iNOS : Monoxyde d'azote synthase inductible

IPH : Hémorragie intraplaque

IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique

- $\mathcal{L}$ -

L_B : Lymphocyte B

LDL : Lipoprotéine de basse densité

LDL-C : Lipoprotéine de basse densité – cholestérol

LDLox : Lipoprotéine de basse densité oxydée

LEE : Limitante (ou lamina) élastique externe

LEI : Limitante (ou lamina) élastique interne

LPS : Lipopolysaccharide

LR/NC : Cœur nécrotique riche en lipides

L_T : Lymphocyte T

- $\mathcal{M}$ -

MCP-1 : Monocyte chemotactic protein-1

M-CSF : Monocyte-colony stimulating factor

MDA : Malondialdéhyde

MEC : Matrice extracellulaire

MET : Équivalent métabolique

MMP : Métalloprotéases

MPO : Myéloperoxydases

- $\mathcal{N}$ -

NADPH oxydase : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite oxydase

NK : Natural killer

NO : Monoxyde d'azote

NOS : Monoxyde d'azote synthase

- $\mathcal{O}$ -

O_2 : Oxygène moléculaire

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

- $\mathcal{P}$ -

PA : Pression artérielle

PAD : Pression artérielle diastolique

PAS : Pression artérielle systolique

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

- $\mathcal{R}$ -

RL : Radicaux libres

ROS : Radicaux libres dérivés de l'oxygène

- $\mathcal{S}$ -

SCVE : Société de la Chirurgie Vasculaire et Endovasculaire de Langue Française

SOD : Superoxyde dismutase

- $\mathcal{T}$ -

TDM : Tomodensitométrie

TG : Triglycéride

TGF-β : Facteur de croissance transformant bêta

TIMP : Inhibiteur de métalloprotéase

TNF-α : Tumor Necrosis Factor α

- $\mathcal{V}$ -

VCAM : Molécule d'adhérence cellulaire vasculaire

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

- $\mathcal{X}$ -

XO : Xanthine oxydase

PARTIE 1 –

AVANT-PROPOS

Les maladies cardiovasculaires représentent à l'heure actuelle la première cause de mortalité dans le monde, représentant 17,5 millions de décès soit 31% de la mortalité mondiale totale, selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Une majorité des maladies cardiovasculaires (cardiopathies coronariennes, maladies cérébro-vasculaires, artériopathies périphériques, etc) est causée par la présence de plaques d'athérosclérose. Ces plaques d'athérosclérose sont composées majoritairement de lipides et de molécules inflammatoires, et affectent la paroi interne de nos vaisseaux, plus particulièrement de nos artères. L'athérosclérose se développe spécifiquement au niveau des bifurcations du système artériel, où le flux sanguin est perturbé, impliquant donc potentiellement les paramètres d'écoulement sanguin. Lorsque qu'une plaque se forme au niveau de la bifurcation carotidienne, sa progression et possible rupture peut entrainer de potentiels évènements ischémiques cérébraux majeurs tels que l'accident vasculaire cérébral, en faisant ainsi un problème majeur de Santé Publique. L'aspect brusque et fulgurant de l'évènement ischémique rend la prévention primaire très complexe. Par conséquent, il n'existe pas à l'heure actuelle, de biomarqueurs de rupture de plaque carotidienne suffisamment efficaces pour prédire avec précision un futur évenement ischémique.

Néanmoins, d'un point de vue mécanistique, il est maintenant bien admis que l'instabilité de la plaque d'athérosclérose est favorisée par trois principaux facteurs de risque : l'hémorragie intraplaque, la néovascularisation et l'accumulation de macrophages, ainsi que des caractéristiques anatomiques telles que la présence d'un cœur nécrotique riche en lipides large et une chape fibreuse amincie. Plusieurs études ont rapporté que la néovascularisation et l'hémorragie intraplaque étaient induite par l'hypoxie, et par un environnement pro-inflammatoire et pro-oxydant dans la plaque (Fayad and Fuster 2001; Dunmore et al. 2007 ; Sluimer et al. 2008 ; Pelisek et al. 2012 ; Chistiakov et al. 2015). De manière intéressante, l'hémorragie intraplaque induit une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et attire des leucocytes par l'intermédiaire de la libération d'hémoglobine libre et de fer, générant ainsi un cercle vicieux entre hémorragie intraplaque, néovascularisation, inflammation et stress oxydant.

A l'inverse, il est aujourd'hui clairement reconnu que l'activité physique réduit l'incidence des maladies cardiovasculaires (Stein et al. 2015) et des évènements ischémiques cardiaques (Sofi et al. 2008). En effet, la littérature a montré que l'activité physique avait des effets bénéfiques sur les facteurs de risque cardiovasculaires (hypertension artérielle, diabète, obésité, tabagisme, etc), sur des biomarqueurs de l'athérosclérose précoces (rigidité artérielle, épaississement de l'intima-media carotidienne, volume de plaque, calcification de l'artère coronaire), sur des facteurs favorisant l'athérogénèse (accumulation de lipides, dysfonction endothéliale, stress oxydant, recrutement leucocytaire, adhérence), ainsi que sur des paramètres hémodynamiques pouvant favoriser la rupture de plaque (viscosité sanguine, déformabilité et agrégation des globules rouges). De plus, il a été montré que la sédentarité était inversement associée à des marqueurs de la santé cardiométabolique (indice de masse corporelle, pression artérielle, triglycérides, lipoprotéines de haute et basse densité) (Prince et al. 2016) et pouvait prédire la survenue de l'athérosclérose (Haapanen-Niemi et al. 2000).

A partir de l'ensemble de ces informations, les principaux objectifs de ce travail de thèse sont dans un premier temps de déterminer les effets de l'activité physique et de la sédentarité sur les facteurs d'instabilité histologiques de la plaque d'athérosclérose carotidienne, et dans un second temps sur les facteurs systémiques associés tels que le stress oxydant, l'inflammation et les paramètres hémorhéologiques. Pour cela, l'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisé sur une cohorte de patients (symptomatiques et asymptomatiques) ayant subi une chirurgie d'endartériectomie. Des analyses histologiques, biochimiques, protéomiques, immunophénotypiques et hémorhéologiques ont été mises en relation avec les niveaux d'activité physique et de sédentarité des patients. Ainsi, la première étude de ce travail s'intéresse aux relations entre les niveaux d'activité physique et de sédentarité, et l'occurrence des facteurs de risque histologiques de plaques de patients asymptomatiques. Les études 2 et 3 sont des études mécanistiques s'intéressant spécifiquement à l'implication de l'inflammation et l'immunité innée dans le processus de déstabilisation de la plaque, indépendamment de l'activité physique dans

un premier temps (étude 2) puis associée à l'activité physique par la suite (étude 3). Enfin, la dernière étude de ce travail consiste en l'évaluation de la relation entre l'activité physique et le profil hémorhéologique des patients souffrant d'athérosclérose carotidienne.

PARTIE 2 – REVUE DE LITTÉRATURE

CHAPITRE 1 : L'ATHEROSCLEROSE, MALADIE CARDIOVASCULAIRE COMPLEXE ET PROBLEME MAJEUR DE SANTE PUBLIQUE

A. GÉNÉRALITÉS

1. Historique de la pathologie

Les premières traces de lésions d'athérosclérose ont été montrées en 1911 par le médecin bactériologiste britannique Ruffer sur des momies égyptiennes datant de 1500 av. JC, démontrant l'aspect ancien et complexe de la pathologie. En 1804, le chirurgien et anatomiste italien Antonio Scarpa fut le premier à décrire une maladie de la couche interne des grosses artères grâce à son travail sur l'anévrisme artériel. Il y expliqua que l'anévrisme de l'aorte résulte « d'une dégénérescence de la couche interne de l'artère, lente, à ulcération pathologique stéatomateuse, fongueuse et squameuse ». C'est ensuite le chirurgien britannique John Hodgson qui fut le premier à faire le lien entre l'inflammation et les lésions athéroscléreuses, résultats qu'il publia dans une monographie en 1815. Cette théorie d'une implication de l'inflammation fut reprise par le pathologiste Virchow en 1856 qui parle alors « d'endartérite déformante ». Dans sa théorie, Virchow introduisit la notion d'irritation chronique de la paroi artérielle par l'infiltration de composants sanguins. Il expliqua également l'épaississement de la paroi par l'inflammation et la prolifération de tissu conjonctif artériel aboutissant à la dégénérescence graisseuse et à la calcification. Quelques années plus tard (1852), le pathologiste autrichien Rokitansky proposa sa théorie thrombogénique « de l'incrustation » suggérant que l'épaississement de la plaque était dû à une accumulation de produits dérivés du sang, principalement de la fibrine, et de fibroblastes provoquant une accumulation secondaire de lipides. Enfin, les pathologistes Ross et Barken proposèrent leur théorie de la multiplication des myocytes qui leur valut le prix Nobel de médecine en 1976. Dans cette théorie, ils expliquent que le développement de la plaque commence par une prolifération de myocytes à partir de myocytes

intimaux, une production de tissu conjonctif et une accumulation de lipides. Ces myocytes seraient à l'origine d'une production de collagène responsable de l'apparition de fibrose. L'ensemble de ces théories démontrent bien la complexité de la pathologie et son aspect multifactoriel. C'est finalement le pathologiste allemand Felix Jacob Marchand qui fut le premier (1904) à utiliser le terme actuel « athérosclérose » associant les notions de sclérose et d'athérome (athéré = « bouillie » en grec).

2. Données épidémiologiques

L'athérosclérose est à l'origine de nombreuses maladies cardiovasculaires, ainsi l'incidence de l'athérosclérose conditionne la mortalité cardiovasculaire. En France, et dans les pays industrialisés, les maladies cardiovasculaires liées à l'athérothrombose, principalement l'infarctus du myocarde (IM), l'accident vasculaire cérébral (AVC), l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) ou encore l'ischémie rénale, représentent la première cause de mortalité, soit environ 31% de la mortalité mondiale totale, ce qui en fait un problème majeur de Santé Publique.

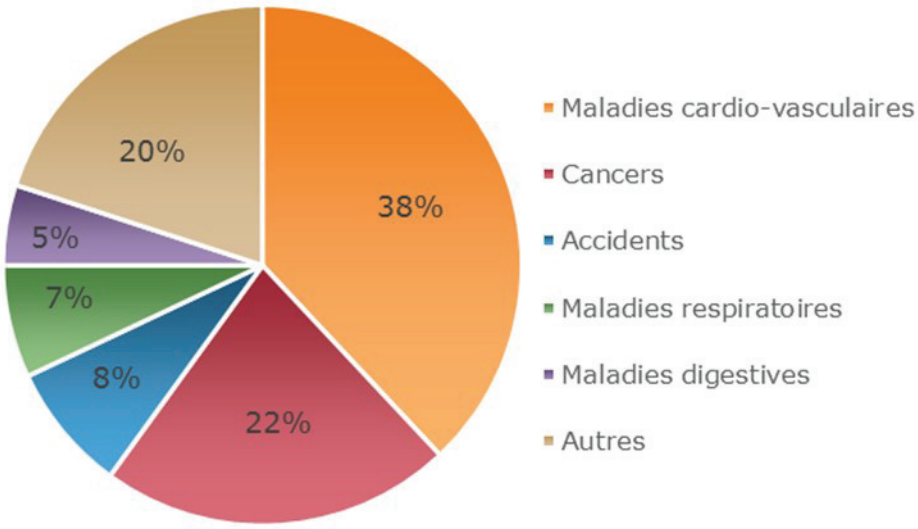


Figure 1. ***Importance des maladies cardiovasculaires en France***
d'après l'Organisation Mondiale de la Santé

Bien que l'incidence de l'athérosclérose soit très variable d'un pays à un autre, voire même d'une région à une autre, il apparait clairement un gradient Nord-Sud (mondial, européen ainsi que national) où les populations du Nord sont plus exposées que les populations du Sud, comme l'a

confirmé l'étude de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) MONICA (**M**ultinational m**ONI**toring of trends and determinants of **CA**rdiovascular diseases(Böthig 1989). En effet, l'incidence de l'athérosclérose est plus élevée en Amérique et Europe du Nord alors qu'elle est plus faible en Europe du Sud et dans les pays asiatiques, confirmant que le niveau d'industrialisation du pays et les habitudes de vie (notamment alimentaires) jouent surement un rôle capital dans l'incidence de l'athérosclérose. L'étude épidémiologique MONICA de la maladie coronaire a démontré que le taux de survenue d'infarctus du myocarde était 10 fois plus élevée en Finlande et en Écosse qu'en Espagne et en Chine. Elle a également permis d'affirmer que la mortalité par infarctus du myocarde a baissé d'environ 20% en 10 ans (Tunstall-Pedoe et al. 1999) par, à la fois une diminution de la fréquence de la maladie et une amélioration de la survie post-évènement. Côté Européen, l'étude EUROASPIRE (**EURO**pean **A**ction through **S**econdary **P**revention by **I**ntervention to **R**educe **E**vents 1997) a été mise en place en 1995 avec l'objectif de déterminer le niveau de prise en charge des facteurs de risque de maladies cardio-vasculaires chez les sujets ayant développé un événement coronaire (infarctus du myocarde, ischémie coronaire, angioplastie ou pontage). Les résultats de cette étude résident dans le constat que la prise en charge et le traitement des facteurs de risque tels que l'hyperlipidémie, l'hypercholestérolémie, le tabagisme ou l'hypertension artérielle, est insuffisante (Amouyel and Montaye 1998). Ces différents facteurs de risque jouent également un rôle très important comme l'a montré l'étude « Ni Hon San » (Takeya et al. 1984) qui a étudié l'incidence de la maladie coronaire dans trois groupes d'individus issus d'une campagne japonaise, un vivant dans son environnement natal de manière traditionnelle, un s'étant émigré à Hawaii et vivant de manière occidentale et un autre s'étant émigré en Californie et s'alimentant suivant un régime très riche en graisses saturées. Les résultats de cette étude ont montré que l'incidence de la maladie était trois fois supérieure dans le groupe Californien par rapport au groupe vivant au Japon dont l'incidence était très faible. Le mode de vie dans les pays industrialisés est généralement néfaste

pour la santé, associant alimentation riche en graisses, sédentarité et tabagisme, et contribue fortement au risque de développement d'une maladie cardiovasculaire.

3. Définition de l'athérosclérose

a. Définition brève

L'athérosclérose est « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la media », ainsi définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1958. Bien que les premières manifestations cliniques surviennent à un âge adulte généralement avancé, l'athérogénèse débute dès l'enfance. Les plaques ont tendance à se développer au niveau des bifurcations artérielles (aortique, carotidienne ou encore coronarienne), en raison du flux sanguin normalement perturbé induisant un épaississement de l'intima.

b. Composition de la paroi vasculaire

La pathologie consiste en la formation de plaques d'athérome le long des parois d'artères de moyen et gros calibre. La paroi artérielle est composée de trois couches bien distinctes, aussi appelées tuniques : l'intima, la couche la plus interne ; la media, la couche intermédiaire et l'adventice, la couche la plus externe. Chacune de ces couches est séparée par une couche concentrique d'élastine appelée limitante élastique (ou lamina élastique), interne (LEI) entre l'intima et la media et externe (LEE) entre la media et l'adventice.

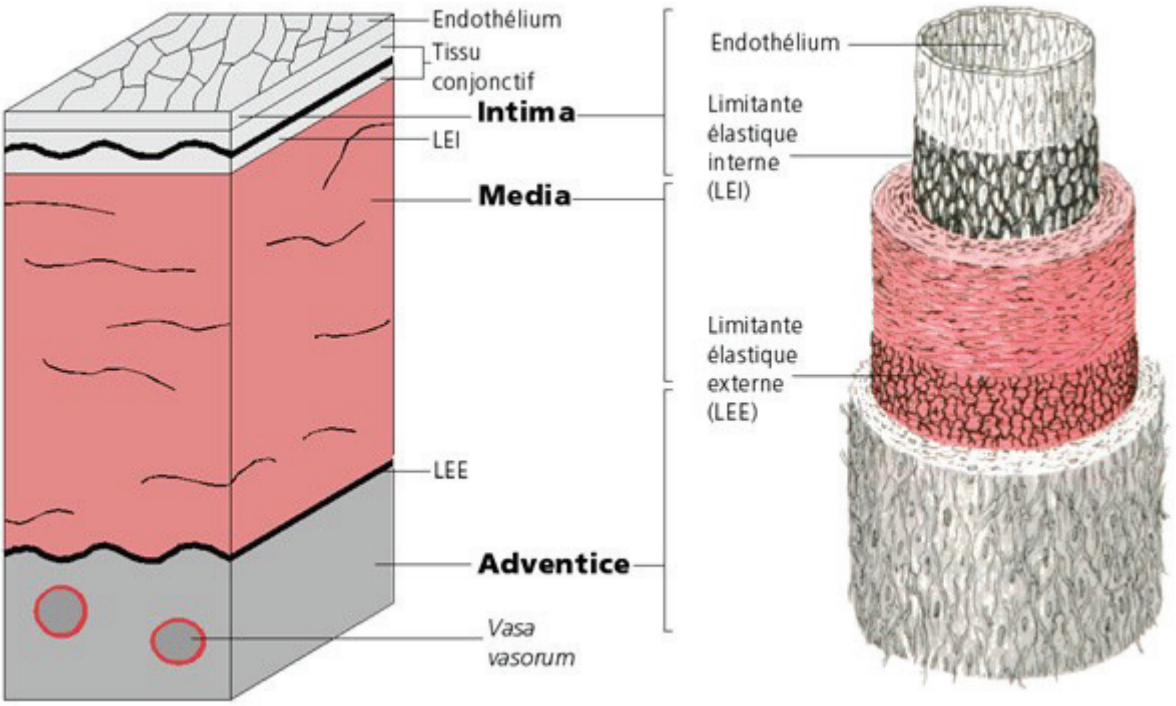


Figure 2. ***Structure de la paroi artérielle***
d'après Kahle et al. 1990 [Anatomie. Tome 2, viscères. 2 éd. Paris : Flammarion Médecine-Sciences]

La plaque d'athérome se forme au niveau de l'intima. L'intima est constituée d'une couche de cellules endothéliales reliées entre elles par des complexes de jonction ainsi que d'une couche de tissu conjonctif fibro-élastique. C'est plus particulièrement au niveau de la couche de tissu conjonctif que se développe la plaque d'athérome. Cette sous-couche endothéliale est composée de fibres de collagène, de fibres musculaires lisses et fibroblastes, de glycogène, d'élastine et de laminine, ainsi qu'une quantité importante de cellules immunitaires (Munsch et al. 1995). L'endothélium joue un rôle primordial dans la bonne santé des vaisseaux sanguins. Il permet de maintenir l'homéostasie vasculaire en agissant sur la perméabilité et le tonus vasculaire, la coagulation et l'angiogenèse. Il va également permettre de réguler la vasomotricité par sécrétion de molécules vasoconstrictrices (e.g. endothéline) et de molécules vasodilatatrices (e.g. monoxyde d'azote NO). Le NO est, en effet, un puissant vasodilatateur, mais aussi un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, un stimulateur de la prolifération des cellules endothéliales, et un puissant antioxydant (Rush et al. 2005).

La media est la tunique moyenne principalement composée de cellules musculaires lisses (CML) contenues dans de la matrice extracellulaire (MEC), délimitées en unités lamellaires (CML + MEC). Cette tunique donne la propriété de vasomotricité au vaisseau, ce sont les CML qui font varier le diamètre du vaisseau selon la situation physiologique de celui-ci. Enfin, l'adventice est la tunique externe composée de tissu conjonctif (collagène, fibres élastiques et fibroblastes), de *vasa vasorum* assurant l'irrigation de l'adventice et d'une partie de la media, et d'une enveloppe permettant la fixation de l'artère aux différentes structures limitrophes.

4. Facteurs de risque modifiables et non-modifiables

De multiples facteurs de risque ont été montrés pour aggraver l'athérosclérose. Parmi ces différents facteurs de risque, nous pouvons en distinguer deux types : les non-modifiables et les modifiables.

a. Facteurs de risque non-modifiables

Le principal facteur de risque non-modifiable associé à l'athérosclérose est **l'âge**. En effet, les premières manifestations cliniques apparaissent à un âge adulte souvent avancé, bien que l'athérogénèse débute dès l'enfance. Chronologiquement, les lésions d'athérosclérose se développent en premier lieu au niveau aortique, puis au niveau coronarien et en dernier lieu au niveau carotidien. L'âge est considéré comme facteur de risque par le fait qu'il traduit le temps où un individu est confronté aux autres facteurs de risque. Le risque de rupture de plaque augmente significativement après 50 ans chez les hommes et après 60 ans chez les femmes (Figure 3) (Piepoli et al. 2016).

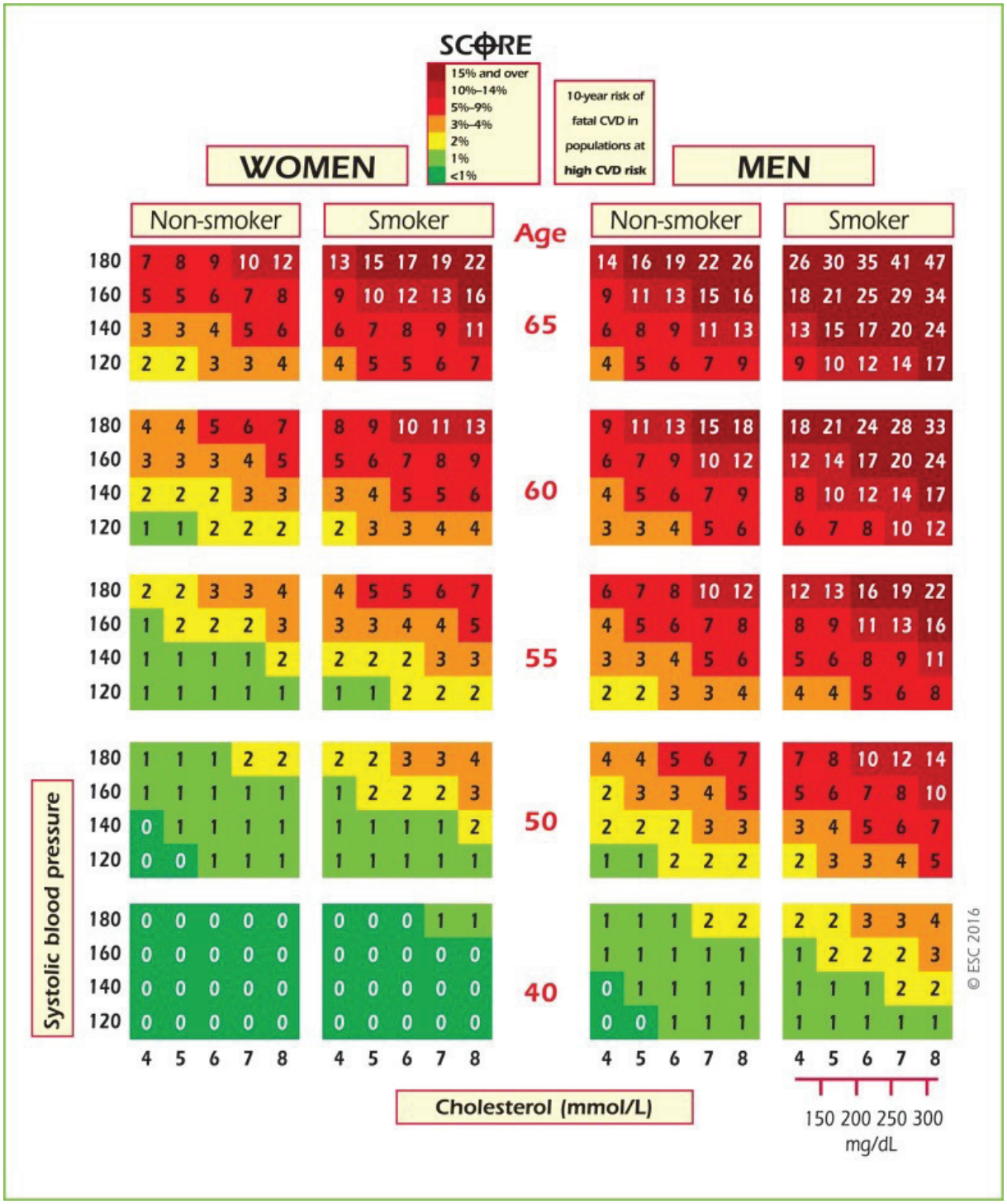


Figure 3. ***Diagramme estimant le risque d'un premier évènement atherosclérotique fatal sur 10 ans***

d'après the SCORE project - Conroy et al. 2003

Ainsi, le second facteur de risque non-modifiable associé à l'athérosclérose est **le sexe**. Il apparait clairement que les hommes sont plus touchés par l'athérosclérose que les femmes (20 infarctus chez la femme pour 100 infarctus totaux). Cette observation s'explique par le rôle protecteur des œstrogènes sur le profil lipidique, la sensibilité à l'insuline ainsi que sur l'hypertension artérielle (Kalin and Zumoff 1990). Néanmoins, cette protection naturelle cesse entre 10 et 15 ans après la ménopause, ce qui explique que l'incidence dans les deux sexes s'égalise après 65 ans (Benjamin et al. 2017) et la mortalité après 75 ans (Figure 4).

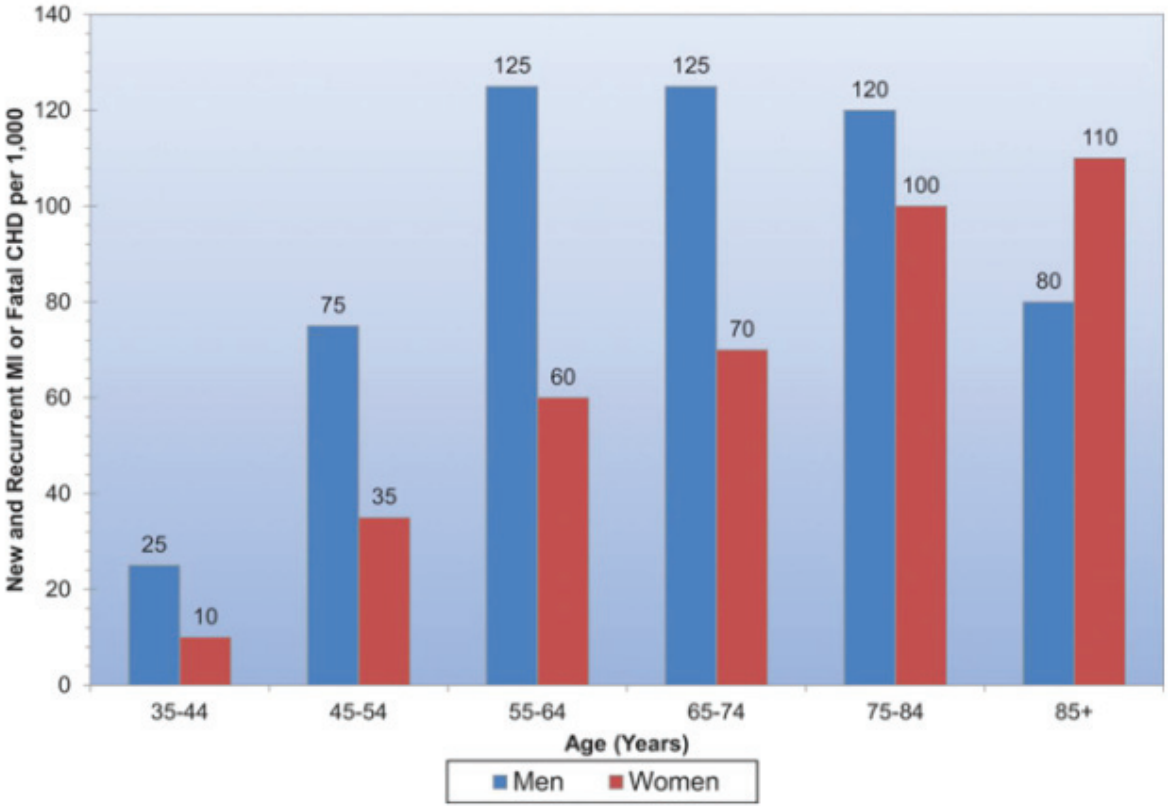


Figure 4. ***Mortalité cardiovasculaire en fonction de l'âge et du sexe***
Nombre de décès causés par infarctus du myocarde ou maladie de l'artère coronaire fatale exprimée pour 1000 personnes, d'après Mozaffarian et al. 2015

Enfin, le dernier facteur de risque non-modifiable associé à l'athérosclérose est **l'hérédité**. Le risque de développer une maladie cardiovasculaire est plus important si un (ou plusieurs) parent au premier degré a subi un évènement cardiovasculaire. Si l'évènement est survenu avant 55 ans pour le père ou avant 65 ans pour la mère, le risque de développer l'athérosclérose augmente d'autant plus (Piepoli et al. 2016). Les antécédents familiaux reflètent à la fois la prédisposition

génétique mais également les habitudes de vie, en particulier les habitudes alimentaires. De nombreux gènes sont impliqués ainsi que de nombreuses interactions gène-gène. En particulier, il a été montré qu'un polymorphisme des gènes ApoB (Chiodini et al. 2003), ApoC III (Olivieri et al. 2002), l'enzyme lipoprotéine lipase (Li et al. 2014b), le fibrinogène (Papageorgiou et al. 2013), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) (Scheer et al. 2005) et l'angiotensine II (Zhu and Meng 2006) sont associés avec l'athérosclérose.

b. Facteurs de risque modifiables

Les facteurs de risque modifiables aggravant l'athérosclérose sont multiples et agissent de manière synergique. En effet, l'association de plusieurs facteurs de risque induit une augmentation exponentielle du risque et pas une simple addition, comme ont pu le démontré les études de cohorte de Framingham (Wilson et al. 1998), l'étude du registre REACH, Redution of Atherothrombosis for Continued Health (Bhatt et al. 2006) ou encore l'étude INTERHEART (Yusuf et al. 2004).

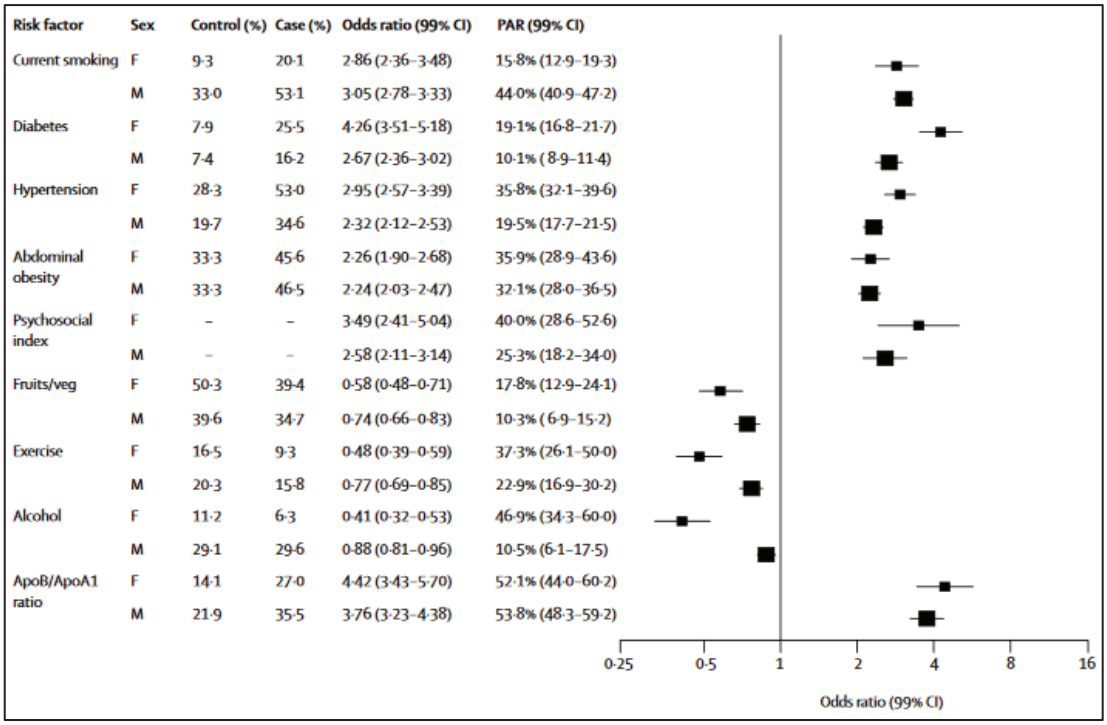


Figure 5. ***Effets de l'ensemble des facteurs de risque et des facteurs protecteurs de l'athérosclérose***

d'après Yusuf et al. INTERHEART Study. Lancet 2004

Tout d'abord, **le tabagisme**, qu'il soit actif ou passif, est un facteur favorisant la synthèse et le développement de la plaque d'athérome. Le monoxyde de carbone contenu dans le tabac provoque une hypoxie chronique alors que les différentes substances toxiques induisent une augmentation de l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL), du fibrinogène, du niveau d'adrénaline et d'une vaso-activité exacerbée. La détermination du risque se mesure en nombre de paquets/années (nombre de paquets consommés par jour multiplié par le nombre d'années de consommation), et le risque augmente proportionnellement avec l'augmentation du nombre de paquets/années. Ainsi, en moyenne le tabagisme augmente par 3,6 fois la mortalité coronaire pour les hommes et par 4,7 pour les femmes (Piepoli et al. 2016).

Le second facteur de risque modifiable est **l'hypertension artérielle** (HTA) qui reflète l'augmentation des valeurs de pression artérielle systolique (PAS) et/ou diastolique (PAD) et est liée à la rigidité des artères élastiques. Il a été montré que lorsque PAS > 115mmHg, le risque cardiovasculaire augmente (Lewington et al. 2002). Différents marqueurs de risque ont été identifiés pour mesurer HTA : des valeurs élevées de PAS, une microalbuminurie qui correspond à la présence d'albumine dans les urines et qui reflète une dysfonction endothéliale, accentuant le risque d'AVC, une hypertrophie ventriculaire gauche, une augmentation de l'épaisseur intima/media carotidienne, une augmentation de la concentration en LDL-Cholestérol, et le développement de diabète.

Autre facteur de risque et histoire de la maladie	Grade 1 (HTA « légère ») Systolique 140-159 ou diastolique 90-99	Grade 2 (HTA « modérée ») Systolique 160-179 ou diastolique 100-109	Grade 3 (HTA « sévère ») Systolique ≥ 180 ou diastolique ≥ 110
Groupe A : pas d'autre facteur de risque	Risque faible	Risque moyen	Risque élevé
Groupe B : 1-2 facteurs de risque	Risque moyen	Risque moyen	Risque élevé
Groupe C : 3 facteurs de risque ou plus, ou atteinte d'un organe-cible, ou diabète*	Risque élevé	Risque élevé	Risque élevé

* Dans le cas de maladies cardio-vasculaires associées, le patient doit être considéré comme à risque très élevé quel que soit son niveau tensionnel, et faire l 'objet d 'une prise en charge spécifique

ANAES / Service des recommandations et références professionnelles
Service évaluation économique / Avril 2000

Tableau 1. ***Stratification du risque pour quantifier le pronostic d'un patient atteint d'une hypertension artérielle***
adapté de WHO-ISH 1999

Le diabète est également un des principaux facteurs aggravant le risque d'athérosclérose. Cette pathologie concerne environ 3% de la population et représente les premières causes de cécité, d'amputation et de dialyse, et double le risque d'incidence d'AVC, de coronaropathie et de mortalité cardiovasculaire. Le diabète est défini par une glycémie à jeun > 1,26 g/L (ou > 7,0 mmol/L) à deux reprises. Les diabètes de type I et II participent à l'augmentation du risque cardiovasculaire, à partir de 30 ans pour le diabète de type I et à partir de 40 ans pour un diabète de type II. Des complications vasculaires sont observées dans 60% des cas de diabètes (micro et macro angiopathie). Il a été montré qu'en moyenne le diabète multiplie par 3 le risque de maladie coronarienne (Piepoli et al. 2016).

Ensuite, **les dyslipidémies** jouent un rôle essentiel dans l'athérogénèse, notamment l'augmentation de LDL-C, la diminution de lipoprotéines de haute densité (HDL) – Cholestérol et l'augmentation du taux de triglycérides (TG). Le risque de développer une maladie cardiovasculaire est proportionnellement lié au taux de cholestérol total et de LDL-C, plus ces taux sont élevés, plus le risque est important (Figure 6). Ainsi, une diminution de 10% du taux de cholestérol total entraîne une réduction de 25% du risque cardiovasculaire à 5 ans, et une

diminution d'1mmol/L de LDL-C entraîne une réduction de 20% du risque à 5 ans (Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators et al. 2012). A l'inverse, les HDL-C jouent un rôle protecteur vis-à-vis de l'athérosclérose, en assurant l'excrétion de la paroi artérielle des autres types de lipoprotéines. Le taux de HDL est naturellement plus élevé chez la femme non-ménopausée que chez l'homme au même âge, même si la consommation d'œstroprogestatifs en diminue la concentration (Guinchard-Foulon et al. 2003). En revanche, une consommation d'alcool modérée permettrait de stimuler la synthèse de HDL-C (Rimm et al. 1999).

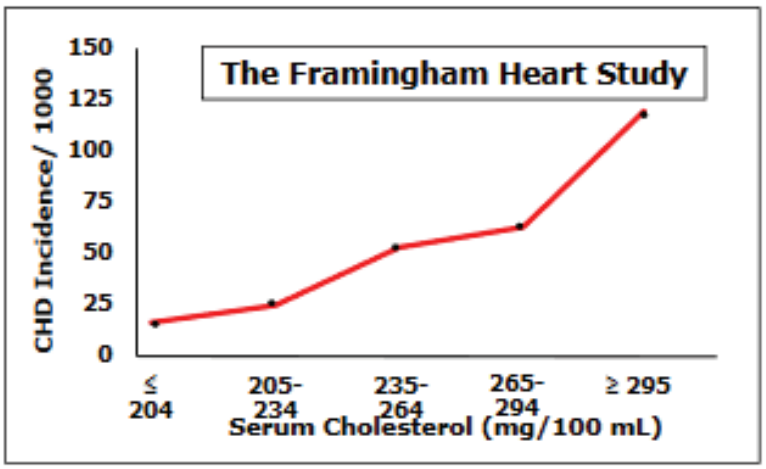


Figure 6. ***Effet du taux de cholestérol total sur l'incidence de la maladie coronarienne***
d'après Castelli WP, the Framingham study, Am J Med 1984

L'obésité a également une importance dans l'incidence de l'athérosclérose. Elle est déterminée par l'indice de masse corporelle (IMC) calculé grâce à la formule = poids (kg) / taille² (m). Entre 27 et 30, l'individu est considéré en surpoids alors qu'au-delà de 30, on parle d'obésité, et d'obésité morbide au-delà de 40. Il est néanmoins important de différencier l'obésité gynoïde (fesses et cuisses) et androïde (abdominaux). C'est l'obésité abdominale qui intervient dans l'incidence de l'athérosclérose, en induisant une résistance à l'insuline, réduisant le taux de HDL-C, augmentant le taux de TG, induisant une dysfonction endothéliale, une HTA et stimulant des phénomènes inflammatoires (Piepoli et al. 2016). Il est possible de la mesurer par la circonférence abdominale (< 102cm pour les hommes et < 88cm pour les femmes).

Enfin, **la sédentarité** est un facteur de risque dont l'importance croit depuis quelques décennies. Ainsi, la plupart des études épidémiologiques associent le risque de mortalité cardiovasculaire au manque d'activité physique régulière (Biswas et al. 2015). Une activité physique de type aérobie modifie plusieurs facteurs de risque tels que le maintien d'un poids normal (Thivel et al. 2013), la diminution de la consommation de tabac (Ussher et al. 2001), la diminution du taux de LDL-C et l'augmentation du taux de HDL-C (Kraus et al. 2002), la diminution de la pression artérielle (PA) (Higashi and Yoshizumi 2004), la diminution de l'agrégabilité plaquettaire et l'augmentation de la fibrinolyse (Kumar et al. 2011), la tolérance au glucose (Mercier et al. 1999), la diminution du stress oxydant et de l'inflammation (Ford 2002; Pialoux et al. 2009a) et également des effets positifs psychologiques (Edwards et al. 2018). Ainsi, la sédentarité augmenterait par deux fois le risque d'infarctus du myocarde (Owen et al. 2010a).

B. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ATHÉROSCLÉROSE

1. Développement de la pathologie : l'athérogénèse

Le processus d'athérogénèse débute par l'accumulation de LDL-C dans l'intima due notamment à la dysfonction endothéliale, qui est reconnue comme étant un marqueur précoce du risque athérogène (Ross 1999). L'athérogénèse se produit spécifiquement au niveau des bifurcations artérielles, où l'endothélium est soumis à des forces de cisaillement perturbées, faibles ou négatives (Gimbrone 1999). Ainsi, cette activation endothéliale se caractérise par une perméabilité accrue facilitant l'infiltration les lipoprotéines dans la paroi vasculaire (Nordestgaard and Nielsen 1994; Williams and Tabas 1995). La présence d'une quantité élevée de LDL circulants est un élément déterminant de l'athérogénèse. L'endothélium a pour rôle de maintenir l'homéostasie endothéliale et vasculaire, via notamment la régulation de la vasomotricité par l'intermédiaire du NO. En cas de dysfonction endothéliale, une diminution de la biodisponibilité du NO est observée, ayant comme conséquence la diminution de ses effets protecteurs (vasodilatateur, antiagrégant, anti-adhérent, antioxydant) mais également une augmentation du

stress oxydant qui provoque alors l'oxydation des LDL (LDLox) par les radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) en réponse à l'activation de la NADPH oxydase endothéliale (Griendling et al. 2000). Suite à l'infiltration et l'oxydation des LDL dans l'intima, l'endothélium va exprimer à sa surface différentes molécules d'adhérence, telles que P- et E-sélectine, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) ou ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) qui peuvent se lier à des ligands de type intégrine, présents sur la membrane des leucocytes. Ainsi, des monocytes circulants vont adhérer à la surface de l'endothélium et s'infiltrer à l'intérieur de la paroi vasculaire par diapédèse sous l'influence de la chimiokine MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1).

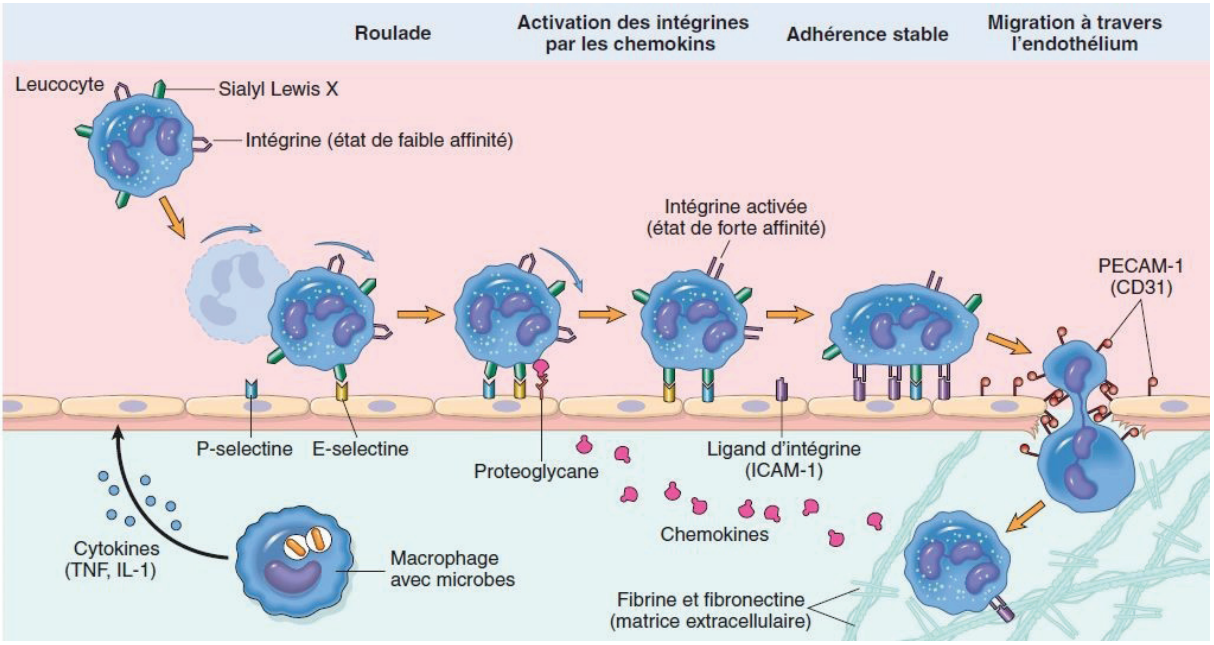


Figure 7. ***Phénomène de diapédèse leucocytaire faisant intervenir les phases de capture, d'adhérence labile et de roulement, d'adhérence forte et de transmigration.***

TNF, tumor necrosis factor ; IL-1, interleukin 1 ; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1 ; PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule 1

Une fois à l'intérieur de l'intima, les monocytes se différencient en macrophages sous l'influence du facteur de croissance hématopoïétique M-CSF (monocyte-colony stimulating factor) synthétisé par les cellules endothéliales et les CML. Par la suite, les macrophages vont internaliser les LDLox via des récepteurs « scavengers » et ainsi se transformer en cellules spumeuses (ou foam cells) (de Winther et al. 2000). L'infiltration de macrophages dans la paroi

vasculaire va alors favoriser le phénomène d'inflammation chronique par la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α (Tumor Necrosis Factor α) ou IL-1 (interleukine 1) qui elles-mêmes vont entretenir l'activation endothéliale permettant la diapédèse leucocytaire (Jonasson et al. 1986). On parle alors de phénomène d'auto-entretien ou auto-amplification. De plus, les cytokines pro-inflammatoires peuvent induire la synthèse de métalloprotéases (MMP-1, MMP-9) qui ont une activité de dégradation de la matrice extracellulaire, et qui jouent un rôle essentiel dans l'instabilité de la plaque. Les macrophages vont également produire des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) et des inhibiteurs de métalloprotéases (TIMP-1, TIMP-2).

Dans un second temps, les cellules spumeuses vont s'accumuler dans l'intima et se regrouper de façon à former des amas. Des lipides devenus extracellulaires vont ainsi s'associer aux amas de cellules spumeuses pour former des stries lipidiques. La strie lipidique est le premier stade de l'athérosclérose, il s'agit d'une structure réversible. Le regroupement de stries lipidiques forme alors le cœur lipidique de la plaque. Les cellules spumeuses à l'intérieur des stries lipidiques sécrètent alors des facteurs de croissance tels que PDGF (platelet derived growth factor) qui favorisent la migration des CML de la media vers l'intima à travers la limitante élastique interne et leur prolifération. Une fois migrées dans l'intima, les CML subissent un changement de phénotype : d'un phénotype différencié « contractile » à un phénotype dédifférencié « sécrétoire ». Ces CML dédifférenciées vont alors sécréter des facteurs de croissance et des protéines de la matrice extracellulaire (collagène, élastine, protéoglycanes) formant ainsi la chape fibreuse (ou fibro-musculaire) qui isole le cœur lipidique de la lumière artérielle. La chape fibreuse est donc un facteur de stabilité de la plaque d'athérome, et son intégrité sera particulièrement importante par la suite.

En 1995, Stary établit une classification histopathologique des lésions athérosclérotiques. Cette étude a permis de discriminer 6 types de lésions, correspondants aux différents stades d'évolution vus précédemment. Pour chaque type de lésion, Stary décrit les composants

histologiques de la plaque et les mécanismes mis en jeu. L'utilité de cette classification, principalement en clinique, réside notamment dans le fait de la rapidité d'analyse de la sévérité de la lésion.

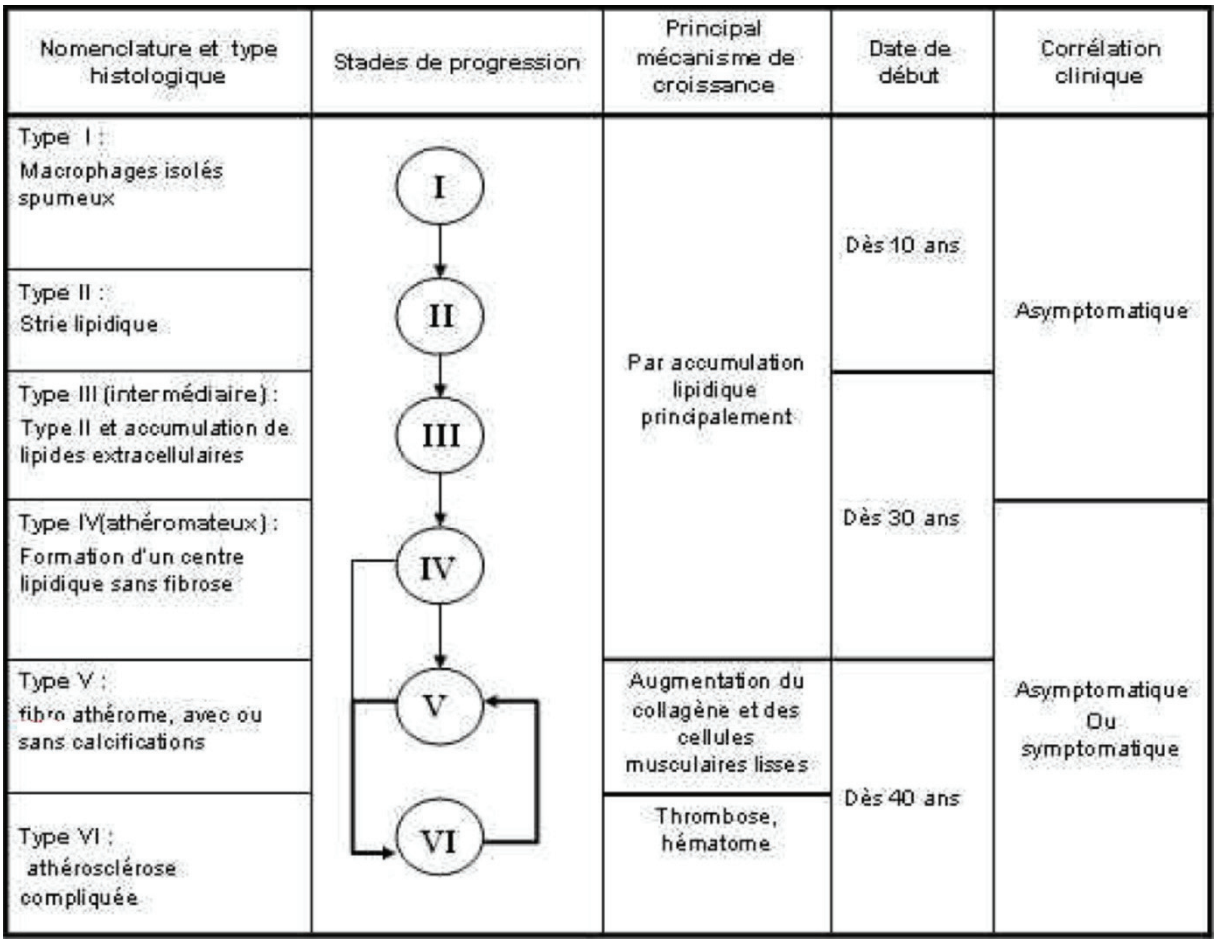


Figure 8. ***Classification histopathologique des lésions athérosclérotiques***
d'après Stary, 1995

2. Progression et évolution de la lésion compliquée

L'évolution de la plaque d'athérosclérose se déroule durant de nombreuses années avec une progression simultanée du cœur lipidique et de la chape fibreuse. Le cœur lipidique progresse à cause de l'infiltration lipidique et de l'accumulation de cellules spumeuses tandis que la chape fibreuse progresse à cause de la prolifération de CML avec synthèse de matrice extracellulaire. L'augmentation du volume de la plaque n'a pas d'incidence sur le diamètre de la lumière artérielle jusqu'à un stade assez avancé de la pathologie. En effet, des phénomènes de remodelage

vasculaire permettent de compenser l'augmentation de volume de la plaque et ainsi retarder l'apparition de sténose artérielle. Les artères élastiques ont la capacité de se dilater pour compenser la protrusion de la plaque. Néanmoins, ce phénomène de remodelage est limité, et une fois les limites atteintes, toute augmentation du volume de la plaque retentit sur la lumière artérielle.

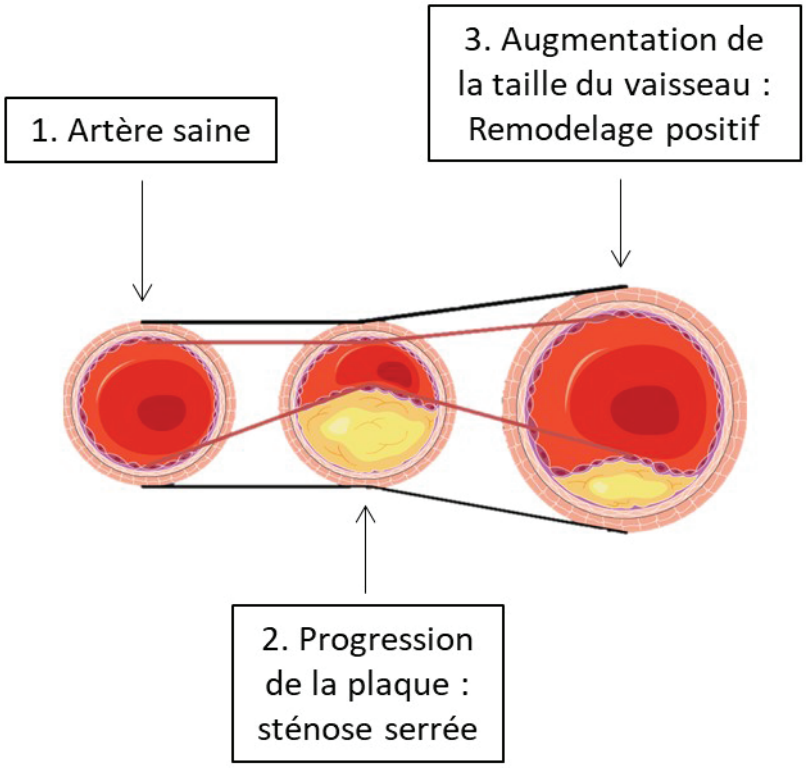


Figure 9. ***Remodelage vasculaire compensateur***

Ainsi, les plaques restent silencieuses/asymptomatiques pendant des années mais peuvent se compliquer brutalement conduisant à la déstabilisation de la plaque. La complication des plaques d'athérosclérose peut être de différentes natures : rupture/érosion, hémorragie ou thrombose. Les phénomènes de rupture ou d'érosion de la plaque résultent principalement de l'amincissement de la chape fibreuse. La conséquence de ces phénomènes, bien que dans la majorité des cas, ce ne soit que de l'érosion et non une réelle rupture, est une mise en contact du sang et des éléments thrombogènes du cœur lipidique. Ainsi, un phénomène de thrombose se met en place, déclenchant l'activation des plaquettes (par les LDLox) et de la cascade de

coagulation (par la présence du facteur tissulaire relargué lors de l'apoptose des macrophages du cœur lipidique). En cas de simple érosion, le sang rentre en contact avec l'espace sous-endothélial, ce qui entraine les mêmes conséquences thrombotiques. Dans une majorité des cas, le thrombus formé rétrécit significativement la lumière artérielle, mais ne l'occlut pas complètement. Ainsi, il s'incorpore lentement à la plaque d'athérosclérose, n'entrainant pas de manifestations cliniques directes (i.e. ischémiques) mais augmentant significativement le volume de plaque. A l'inverse, il est possible que le thrombus formé obstrue totalement le vaisseau (ou l'artère) ou alors qu'il aboutisse à la formation d'une embolie, menant potentiellement à une ischémie aigue d'un territoire vasculaire en aval et entrainant de lourdes conséquences cliniques.

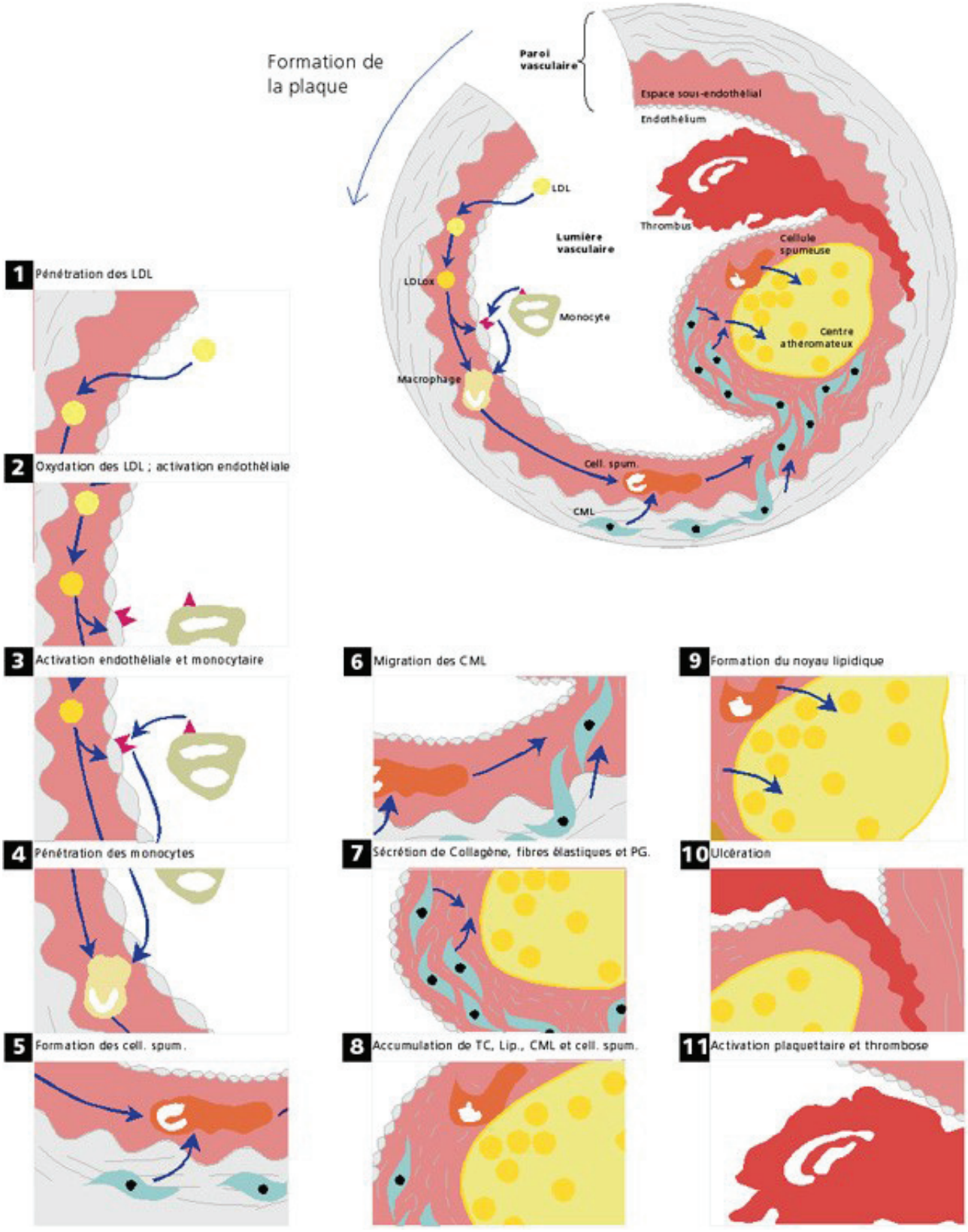


Figure 10. ***Formation de la plaque d'athérosclérose : vue générale et détail des étapes.***

D'après Jérôme LÉONI. "Physiopathologie de l'athérosclérose - Mécanismes et prévention de l'athérothrombose." Thèse d'exercice pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie (février 2001) - sous la direction du Professeur Edwige DAUBROSSE

3. Complications cliniques

La plaque d'athérosclérose se développe dans différents territoires du système vasculaire. Bien que la nature de la complication (rupture/érosion, thrombose, etc.) ne soit pas dépendante du territoire concerné, la manifestation clinique quant à elle diffère selon la localisation de l'athérome. On pourra noter 3 localisations préférentielles entrainant des manifestations cliniques importantes : les artères coronaires, les artères iliaques et/ou fémorales et les artères carotides.

Au niveau du myocarde, une plaque localisée dans une artère coronaire peut avoir différentes conséquences cliniques. En cas de sténose modérée et de survenue progressive, le patient peut ressentir au repos ou à l'effort, une douleur dans la poitrine appelée angor ou angine de poitrine. L'angine de poitrine correspond à un déséquilibre entre l'apport et la demande en oxygène au niveau du myocarde (aussi appelée ischémie myocardique). En revanche, si la sténose s'aggrave brutalement (rupture de plaque) conduisant à une occlusion complète, le patient souffrira d'un syndrome coronarien aigu ou infarctus du myocarde (IM).

Au niveau des membres inférieurs, une plaque localisée dans une artère iliaque ou fémorale peut également avoir différentes conséquences cliniques. De la même manière que la coronaire, en cas d'occlusion progressive (partielle ou complète), le patient peut ressentir une douleur à l'effort due à une ischémie à l'effort, que l'on appelle claudication intermittente. Néanmoins, au repos, aucune douleur n'est ressentie. Il est important de noter que si l'occlusion, même complète, intervient progressivement, elle ne causera pas forcément de conséquences cliniques majeures, grâce au développement d'une circulation collatérale (Faber et al. 2014) permettant ainsi de garantir l'apport de sang oxygéné au reste du membre inférieur. A l'inverse, en cas d'occlusion brutale et complète, le patient peut souffrir d'ischémie aiguë de membre, avec mise en jeu du pronostic du membre inférieur.

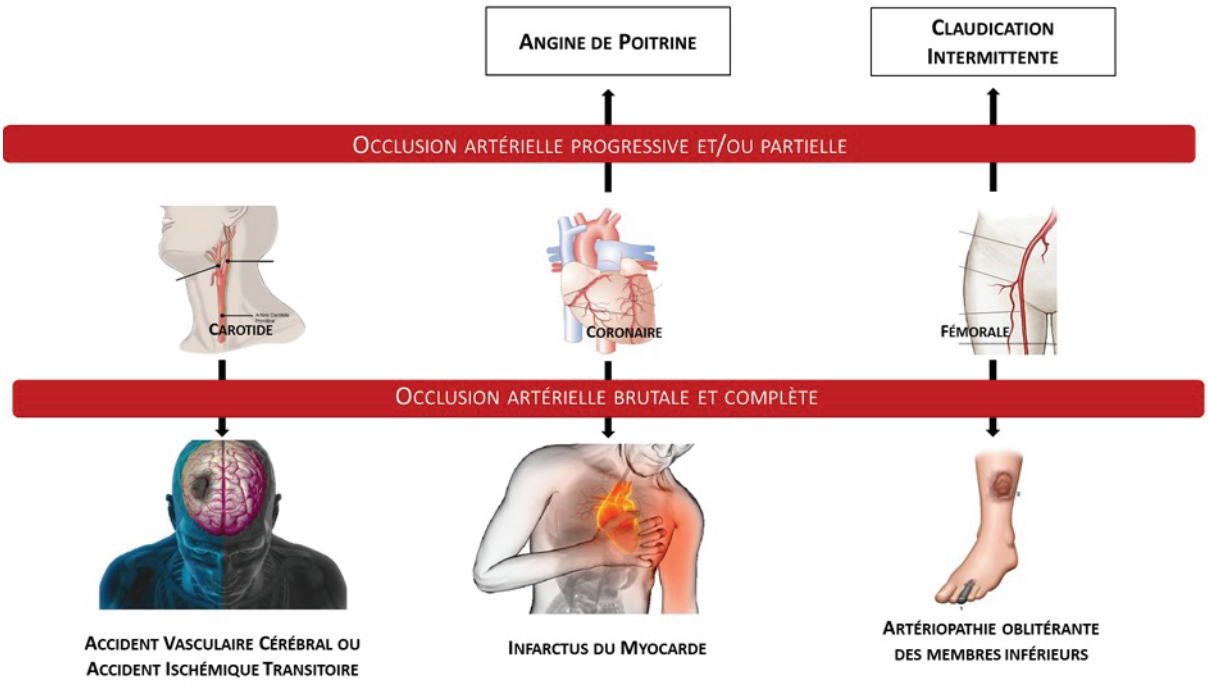


Figure 11. ***Manifestations cliniques de l'athérosclérose en fonction du territoire vasculaire touché***

Enfin, une plaque localisée dans une artère carotide peut également avoir différentes conséquences cliniques au niveau cérébral, selon le caractère vulnérable à risque embolique de la plaque. Dans le cas d'une occlusion progressive, comme expliqué précédemment, il est parfaitement possible que le patient ne subisse aucune conséquence clinique. A l'inverse, en cas d'occlusion brutale et complète, le patient peut subir un accident vasculaire cérébral pouvant causer la perte de vision d'un œil, ou un déficit moteur selon la localisation cérébrale de l'ischémie.

4. Risque de l'Activité Physique aigue

Il est aujourd'hui bien admis que l'activité physique est bénéfique pour la Santé. Il est néanmoins important de préciser que le type d'activité physique pratiqué n'engendre pas les mêmes réponses physiologiques, chez le sujet sain ou chez le patient cardiovasculaire. En effet, alors que l'activité physique régulière (ou chronique) entraine des adaptations physiologiques

favorables à une bonne Santé, comme nous le détaillerons par la suite, il apparait que les effets d'activité physique aigue sont plus controversés.

L'activité physique aigue est définie, par l'OMS, comme tout mouvement produit par les muscles squelettiques, responsable d'une augmentation de la dépense énergétique (par rapport à celle de repos), et ayant une durée limitée dans le temps. L'activité physique aigue entraine des changements métaboliques transitoires pour restaurer l'homéostasie. Les conséquences d'une telle activité ont été bien étudiées chez le patient atteint de maladie cardiovasculaire. L'ensemble de ces études s'accordent à dire que l'activité physique aigue et intense pourrait augmenter le risque de rupture de plaque d'athérosclérose et ainsi le risque d'évènements ischémiques majeurs tels que la mort subite d'origine cardiaque, en particulier chez des sujets déconditionnés (Burke et al. 1999; Albert et al. 2000).

Plusieurs études, dont certaines de très grande ampleur (Burke et al. 1999 ; Albert et al. 2000 ; Whang et al. 2006 ; Tanaka et al. 2008), se sont penchées sur les effets d'un exercice appelé vigoureux, ayant été défini comme un effort nécessitant une dépense énergétique supérieure à 5 et 4 équivalents métaboliques (MET) (respectivement Whang et al. 2006 ; Tanaka et al. 2008). L'ensemble de ces études s'accordent sur plusieurs points : la fréquence de survenue de rupture de plaque et mort subite d'origine cardiaque induite par un effort aigu et intense est très faible (<1% dans les études de grande ampleur, respectivement 122 morts sur 21481 sujets pour Albert et al. et 288 morts sur 84888 sujets pour Whang et al.), et ces évènements sont plus fréquents chez des sujets sédentaires ou déconditionnés (84% des sujets décédés subitement étaient déconditionnés pour Burke et al. (1999).

Concernant les mécanismes pouvant expliquer la survenue de rupture de plaque et de mort subite d'origine cardiaque par l'exercice aigu et intense, plusieurs paramètres sont mis en avant. Tout d'abord, la composition anatomique de la plaque semble avoir son importance. En effet, Burke et al. (1999) rapportent que les sujets étant décédés pendant une activité physique aigue

présentaient un ratio « cholestérol total/HDL-C » plus élevé que ceux étant décédés au repos. De la même manière, la présence d'hémorragie intraplaque (IPH) était plus fréquente chez ce groupe de sujets, ainsi qu'une chape fibreuse (CF) fine et un *vasa vasorum* étendu. Des paramètres de coagulation du sang peuvent également avoir un rôle dans la rupture. En effet, une augmentation de l'activation plaquettaire pouvait survenir à l'effort intense ainsi qu'une diminution de l'activité fibrinolytique simultanée (Willich et al. 1993), à l'origine de l'infarctus du myocarde notamment.

Dans un second temps, il a été montré à plusieurs reprises qu'une augmentation accrue de l'intensité de l'exercice induisait une augmentation du stress cardiaque, à la fois due à un plus haut pourcentage de la fréquence cardiaque maximale (FC max) sollicitée et la production d'une quantité plus importante de catécholamines dans la circulation sanguine (Eijsvogels et al. 2016). Les catécholamines sont une famille d'hormones synthétisées par le système nerveux orthosympathique, dont le taux est augmenté en cas de stress (adrénaline, noradrénaline, dopamine) qui induisent une augmentation de la FC, de la pression artérielle, et de la glycémie. Elles sont donc reconnues pour être arythmogènes (capables de générer un trouble du rythme cardiaque).

Enfin, des facteurs mécaniques semblent être le plus impliqués dans la rupture de plaque. Bien qu'il n'y ait pas de consensus quant à la position précise de la rupture de la chape fibreuse (milieu de CF pour Burke et al. 1999 ; et à l'épaulement pour Tanaka et al. 2008), chacun d'entre eux implique la force des contraintes de cisaillement dans l'explication de la rupture de la chape fibreuse, et en particulier l'augmentation du shear stress induit par l'activité physique aigue et intense.

C. L'ACCIDENT VASCULAIRE CÉRÉBRAL

1. Définition

L'accident Vasculaire Cérébral (AVC) est un déficit soudain de la fonction cérébrale et résulte de l'interruption de la circulation sanguine dans le cerveau, en général quand un vaisseau éclate ou est bloqué par un caillot, selon l'OMS. L'apport en oxygène et en nutriments est stoppé, ce qui endommage les tissus cérébraux. Il existe plusieurs types d'AVC, classés selon leur gravité (AIT et AIC) et selon leur origine (AVC ischémique et AVC hémorragique).

L'accident ischémique transitoire (ou AIT) est défini par la résolution spontanée des signes cliniques dans les 24 heures suivant leur survenue. L'accident ischémique constitué est défini par la persistance des symptômes au-delà des 24 heures avec parfois des séquelles sévères et irréversible. Parmi ceux-ci, 80% des accidents sont dus à une ischémie provoquant un infarctus cérébral par obstruction d'un vaisseau sanguin. L'occlusion totale d'une artère cérébrale est à l'origine de l'AVC ischémique, provoquant une privation d'oxygène et de glucose du territoire cérébral initialement irrigué par l'artère en question et ainsi un infarctus cérébral. L'occlusion du vaisseau est induite soit par un caillot (ou embolie) formé localement ou résultant de la rupture d'une plaque d'athérome carotidien, soit par une plaque obstructive. Dans une moindre mesure, l'occlusion peut être due à la déchirure de la paroi artérielle (dissection artérielle) ou encore à la compression par une tumeur. Les 20% restants représentent des AVC hémorragiques, provoquant la rupture d'un vaisseau et ainsi un saignement dans le cerveau. La rupture du vaisseau, ou alors d'un anévrisme artériel (i.e. gonflement d'une artère cérébrale) est principalement due à une pression sanguine excessive (par exemple, en cas d'hypertension artérielle). Un hématome se forme alors induisant des symptômes neurologiques d'apparition brutale en fonction de la localisation cérébrale de la lésion. Un œdème peut alors se former autour de l'hématome, qui aggrave alors la compression du cerveau dans la boîte crânienne.

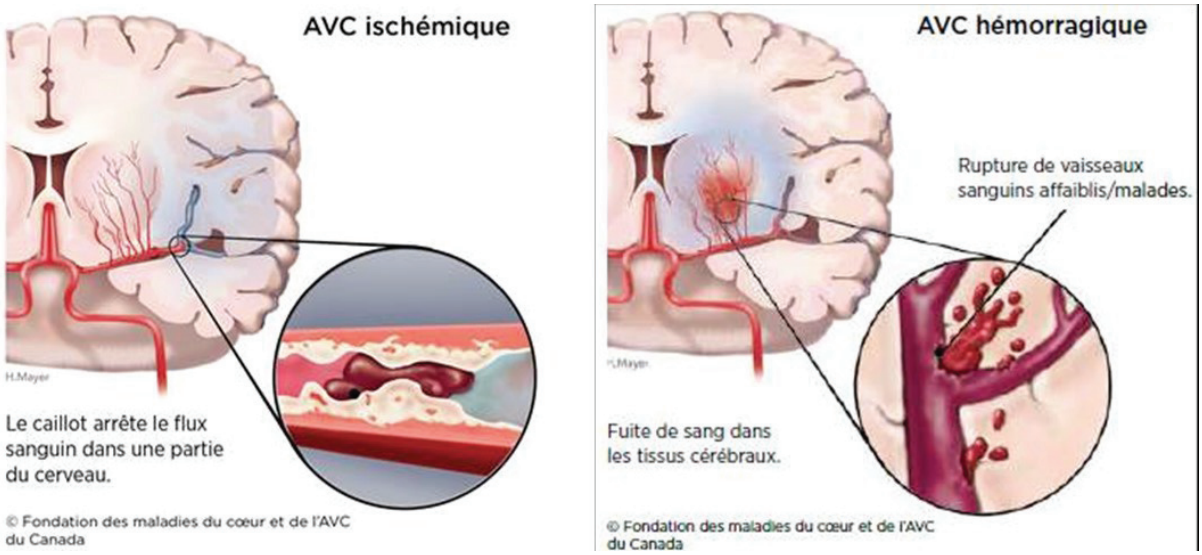


Figure 12. ***Classification des différents types d'AVC***
D'après Fondation des maladies du cœurs et de l'AVC du Canada

Les symptômes en lien avec l'occlusion artérielle peuvent être multiples : déficit moteur, déficit sensitif, troubles phasiques, troubles de l'équilibre, troubles de la vision. Une céphalée (maux de tête) aigue ou inhabituelle peut aussi être présente.

Dans le monde, plus particulièrement dans les pays développés, l'AVC représente la seconde cause de mortalité, et la sixième cause de handicap à long-terme. L'OMS qualifie l'AVC de pandémie à cause de la projection suivante : incidence de l'AVC augmentée de 16 millions en 2005 à 23 millions en 2030, et mortalité augmentée de 5,7 millions à 12 millions pour la même période. Ces prévisions d'augmentation sont notamment dues au mode de vie de plus en plus sédentaire dans les pays industrialisés (ainsi que malnutrition et stress). Néanmoins, en France, l'AVC représente la troisième cause de mortalité, devancé par l'infarctus du myocarde et les cancers. Il touche principalement les personnes âgées (environ 70 ans en moyenne), mais l'AVC peut se produire à tout âge.

2. Examens diagnostics et traitements actuels

a. Examens diagnostics

Avant la survenue d'évènements graves tels que l'AVC, l'AOMI ou l'infarctus du myocarde, le développement de plaques athéromateuses est un processus silencieux et qui ne présente pas ou peu de signes précurseurs. Ceci rend donc le diagnostic et la prévention primaire relativement compliqués. Néanmoins, il existe une large panoplie d'examens diagnostics permettant de confirmer la présence d'athérosclérose.

En cas de surplus de poids et d'hérédité cardiovasculaire, la première indication du médecin traitant est un examen biologique annuel par une prise de sang. Cet examen permet de mesurer et contrôler la concentration des lipides (dosages de LDL-C, triglycérides, cholestérol total, HDL-C) et des glucides (dosage du glucose). Des niveaux en dehors des normes peuvent être le signe de facteurs de risque (dyslipidémies) de l'athérosclérose, entrainant la prescription d'examens complémentaires. Ainsi, dans le cas où le patient présente plusieurs facteurs de risque cardiovasculaires (Tableau 1) et d'antécédents familiaux (infarctus du myocarde, mort subite ou AVC chez un parent proche masculin avant 55 ans ou chez un parent proche féminin avant 65 ans) le médecin traitant va prescrire des examens afin de rechercher la présence de plaques d'athérosclérose dans l'ensemble du territoire vasculaire, notamment par l'intermédiaire d'un échodoppler.

FACTEURS DE RISQUE CV	CARACTERISTIQUES
AGE	Hommes > 50 ans ; Femmes > 60 ans
DIABETE	Glucose à jeun > 1,1 g/L
HYPERTENSION ARTERIELLE	> 130/85 mm Hg
TABAGISME	Quotidien ou sevrage <3 ans
OBESITE	IMC > 30 kg/cm²
DYSLIPIDEMIES	LDL-C > 1,60 g/L et HDL-C < 0,40 g/L
SEDENTARITE	Comportement sédentaire > 8h/jour

Tableau 2. ***Définition des principaux facteurs de risque cardiovasculaires***

L'échodoppler est un examen permettant l'exploration du réseau vasculaire. Il associe l'échographie qui permet de visualiser les vaisseaux d'intérêt, et la fonction « doppler » qui permet d'observer l'écoulement du sang ainsi que son caractère (homogène ou turbulent). C'est un examen de base de la fonction cardio-vasculaire qui est simple, non-invasif et indolore. Actuellement, en France, il est recommandé aux patients atteints de diabète de type 2 d'effectuer un échodoppler tous les ans. Néanmoins, en cas de présence d'un seul facteur de risque cardiovasculaire, la pratique de l'échodoppler n'est pas systématique.

Les examens servant au diagnostic diffèrent en cas de suspicion d'athérosclérose coronarienne ou carotidienne. En effet, en cas d'athérosclérose coronarienne, et ainsi de risque d'infarctus du myocarde ou mort subite, le médecin pourra faire pratiquer un ECG, ou alors un test d'effort. Ces trois examens vont permettre au praticien d'évaluer le rythme cardiaque du patient au repos et à l'effort, et ainsi facilement détecter une potentielle anomalie sinusale. Au contraire, en cas d'atteinte carotidienne, le médecin pourra faire pratiquer un échodoppler (comme vu précédemment) des artères carotidiennes et des artères du cou et du cerveau accessibles à l'échographie, ainsi qu'un ECG afin de détecter une anomalie sinusale à l'origine d'une potentielle embolie.

Ainsi, si l'échodoppler (présence de sténose > 70%) et les différents examens diagnostics sont positifs, le patient est adressé au chirurgien vasculaire. Celui-ci va alors pratiquer des examens complémentaires afin de déterminer l'importance de la lésion, sa localisation précise et son caractère instable dans le but de préparer au mieux la chirurgie (type de chirurgie, abord, technique utilisée, que nous détaillerons dans la section suivante). Pour ceci, plusieurs examens sont à la disposition du chirurgien : le scanner, l'angioscanner ou encore l'Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM).

Le **scanner**, ou tomodensitométrie (TDM) est une technique d'imagerie médicale qui utilise les rayons X afin de réaliser des images en coupe de tissus ou d'organes reconstruites par traitement

informatique. Pour améliorer la qualité des images, un produit de contraste iodé peut être injecté au patient en amont du scanner. L'angioscanner correspond à un scanner des vaisseaux sanguins (veines ou artères). C'est l'examen majeur dans la prise en charge de maladie des artères, avant la chirurgie.

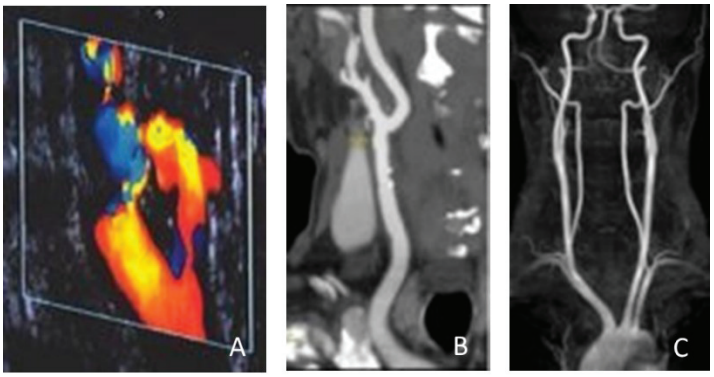


Figure 13. ***Exemple d'images d'échodoppler (A), d'angioscanner (B) et d'angio-IRM (C) carotidiens***

d'après Dr N. Paraskevas, <http://www.dr-paraskevas.fr/category/fr/318/quels-sont-les-examens-necessaires-pour-le-diagnostic-et-pour-guider-le-traitement.html>

Néanmoins, l'**IRM** (et l'angio-IRM) devient de plus en plus fréquente dans le diagnostic et la prise de décision chirurgicale. L'IRM est une autre technique d'imagerie médicale impliquant l'interaction entre un champ magnétique et les atomes d'hydrogène de l'organisme du patient. Brièvement, l'IRM est composée d'un aimant très puissant qui en envoyant des ondes, fait vibrer les noyaux atomiques d'hydrogène des différents tissus de l'organisme du patient. En revenant à leur état de stabilité (ou d'équilibre), les noyaux d'hydrogène vont envoyer un signal dans une antenne réceptrice de l'IRM et ainsi créer les images de l'organisme. De même que l'échodoppler et le scanner, l'IRM est un examen non-invasif et indolore, et ne présente pas de risque pour la santé du patient. Dans le cas du diagnostic de l'athérosclérose, l'IRM va permettre de définir, plus précisément que l'angioscanner, la localisation de la plaque, sa composition et son état de stabilité. En effet, à l'heure actuelle, l'IRM apparait comme étant la technique d'imagerie la plus efficace pour détecter les facteurs d'instabilité de la plaque d'athérosclérose, et préciser la décision chirurgicale.

b. Traitement chirurgical

A l'heure actuelle, en France et dans le monde entier, le principal traitement de l'athérosclérose carotidienne, qu'elle soit symptomatique ou asymptomatique, est le traitement chirurgical, en particulier la chirurgie d'endartériectomie. Cette technique chirurgicale vise à l'ablation de la plaque d'athérome. Néanmoins, il existe d'autres pratiques chirurgicales ayant pour but de restaurer le diamètre de la lumière artérielle : l'angioplastie avec ou sans pose de stent (ou endoprothèse) (Figure 14) et le pontage à l'aide d'une prothèse (Figure 15G).

L'angioplastie est une procédure chirurgicale réalisée pour dilater une artère obstruée partiellement par une plaque d'athérome à l'aide d'un ballonnet gonflé dans l'artère. Le gonflage du ballon au niveau de la lésion permet d'écraser la plaque responsable de la sténose, et ainsi restaurer la lumière artérielle. Cependant, cette procédure est assez controversée car elle induit un important taux de resténose carotidienne (i.e. de récidive de la sténose) (Brott et al. 2011). Ainsi, une alternative est généralement proposée : la pose de stent. Le stent est un petit dispositif métallique tubulaire qui permet de maintenir l'ouverture de l'artère. Ainsi, lors de l'angioplastie, le stent est placé autour du ballonnet, et lors du gonflage de celui-ci, le stent se dilate et se colle à la paroi artérielle. Ensuite, lorsque le ballon est dégonflé, le stent reste en place, empêchant le retour élastique de la sténose.

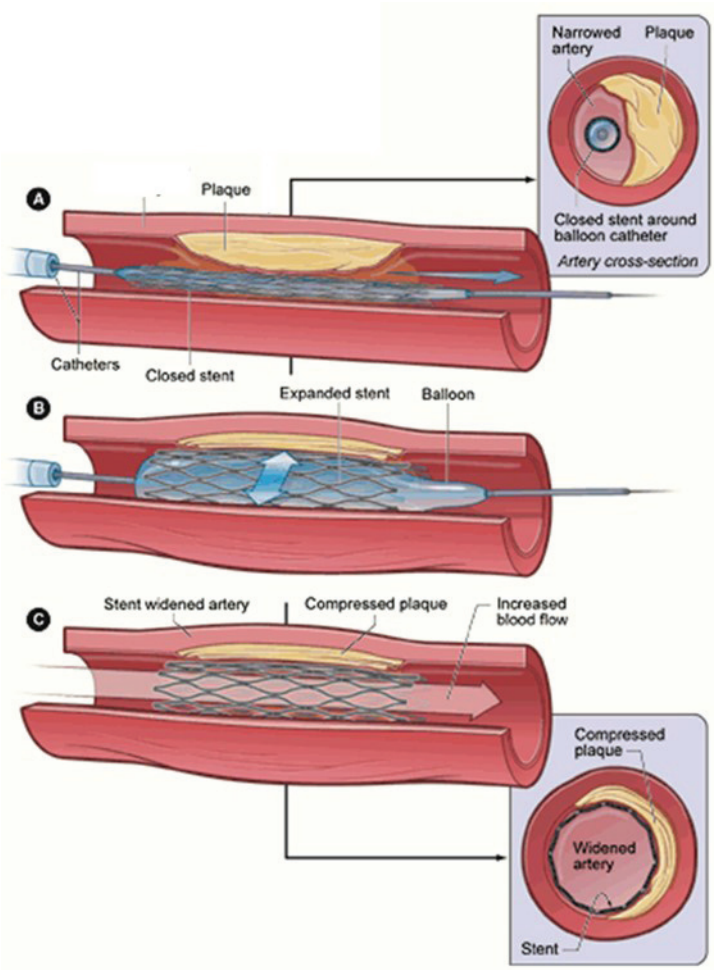


Figure 14. ***Procédure chirurgicale d'angioplastie avec pose de stent***
A, insertion du ballonnet dégonflé avec le stent autour du ballonnet dans l'artère au niveau de la plaque d'athérosclérose ; B, gonflage du ballonnet et dilatation du stent, écrasant la plaque ; C, dégonflage et retrait du ballonnet, le stent reste en place
d'après <http://www.qldcardiology.com.au/coronary-angioplasty.html>

En France, l'angioplastie avec pose de stent sur sténose carotidienne asymptomatique est une procédure rare (et réservée aux patients présentant un cou hostile à la chirurgie (cicatrice, radiothérapie) ou une resténose après endartériectomie).

Le traitement majeur, à l'heure actuelle dans le monde, est la chirurgie d'endartériectomie. Il s'agit de la procédure la plus utilisée et la plus efficace qui correspond à l'ablation de la plaque d'athérome. Pour ceci, deux techniques différentes sont possibles : l'endartériectomie traditionnelle (Figure 15A, 15B, 15C) avec fermeture par patch (afin d'élargir l'artère) ou alors par la technique d'éversion (Figure 15D, 15E, 15F). Dans certains cas de figure, il peut être utile de réaliser un pontage (Figure 15G). La chirurgie peut se dérouler sous anesthésie locorégionale,

ainsi le patient reste éveillé pendant la totalité de la chirurgie. Ceci permet à l'équipe chirurgicale, en particulier l'infirmier anesthésiste, de vérifier qu'aucun problème cérébral, d'ordre neurologique ou ischémique n'intervient durant l'opération, en particulier lors de l'étape du clampage carotidien. De plus, le patient est monitoré pendant la chirurgie (prise de pression artérielle) afin de surveiller de potentiels problèmes de bradycardie et d'hypotension opération-dépendante. La procédure dure en moyenne entre 1h et 2h, et le suivi post-opératoire peut varier entre 3 et 6 jours, selon les suites post-opératoires des patients.

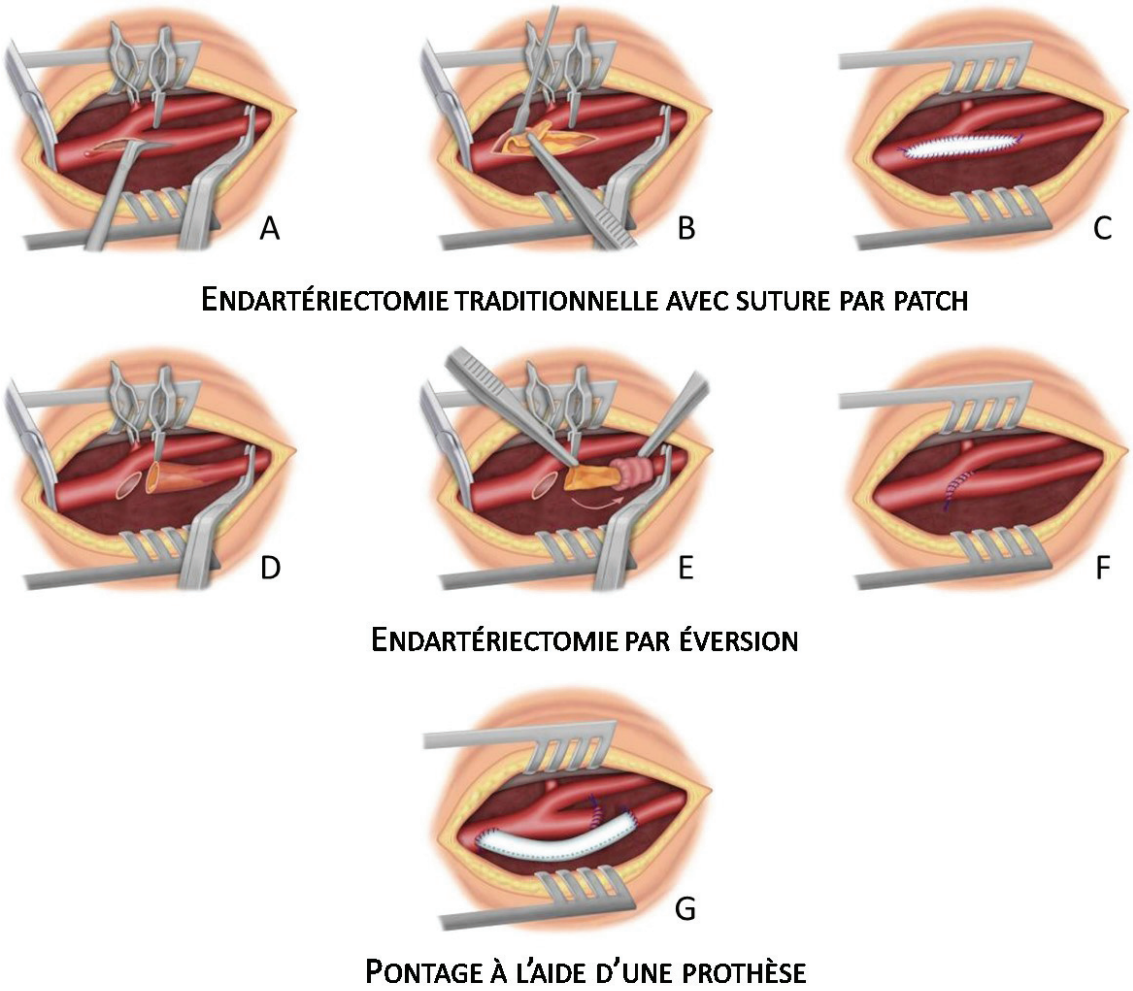


Figure 15. ***Etapes de la chirurgie d'endartériectomie, selon les deux approches majeures***

A, ouverture de la carotide ; B, ablation de la plaque ; C, suture par patch carotidien
D, ouverture de la carotide ; E, retrait de la plaque par éversion ; F, suture directe ;
G, pontage à l'aide d'une prothèse,
d'après la Société de la Chirurgie Vasculaire et Endovasculaire de Langue Française (SCVE) <http://www.vasculaire.com/fr/Maladies/Stenose-Carotidienne/Quels-sont-les-principaux-traitements-Quels-sont-les-risques-de-ces-traitements>

La décision de pratiquer ou non la chirurgie d'endartériectomie est basée sur le pourcentage de sténose. Il a été montré que le bénéfice de la chirurgie croit avec le pourcentage de sténose (Rothwell et al. 2003). Néanmoins, il a été constaté que certaines chirurgies semblent être inadéquates au regard du ratio bénéfice/risque de l'endartériectomie, chez certaines catégories de patients même avec un pourcentage de sténose élevé (Barnett et al. 2002). Dans leur revue, Barnett et al confirment que la chirurgie est effectivement appropriée pour les patients présentant une sténose sévère (>70%) et modérée (50% à 69%), mais uniquement dans le cas de patients symptomatiques. La question est plus controversée dans le cas de patients asymptomatiques. En effet, la chirurgie apparaît inadéquate chez des patients asymptomatiques présentant une sténose serrée mais dont l'instabilité ne semble pas importante, qui à l'heure actuelle sont des patients opérés mais parfois à tort. Au contraire, l'endartériectomie pourrait être intéressante pour des patients présentant une sténose moins prononcée mais dont l'instabilité pourrait être importante, qui eux ne sont pas forcément opérés, voire pas détectés. Ainsi, il semble très probable de voir émerger de plus en plus de patients avec une sténose carotidienne serrée mais non-opérés, à qui il est important de pouvoir proposer un traitement adéquat.

c. Traitement médicamenteux

Malgré le fait que le traitement majeur de l'athérosclérose carotidienne soit la chirurgie d'endartériectomie, on rapporte de plus en plus d'essais cliniques dont le but était de définir le meilleur traitement chirurgical possible pour les patients souffrant de sténoses carotidiennes symptomatiques (Naylor et al. 2003). De fait, la question émergeant de ces essais réside dans la différence entre un traitement chirurgical et un traitement médicamenteux (European Carotid Surgery Trial-2, ECST-2). Le but de ces essais est de mieux caractériser et identifier les candidats à la chirurgie et les patients pour qui un traitement médicamenteux serait préférable. Il est donc intéressant de détailler précisément la prise en charge médicamenteuse des patients (Paraskevas et al. 2016). Cette prise en charge repose essentiellement sur le traitement des facteurs de risque cardiovasculaires que nous avons évoqué auparavant, et fait intervenir à la

fois une médication et une amélioration du style de vie (activité physique et diététique), que nous détaillerons dans le paragraphe suivant.

Le premier facteur de risque cardiovasculaire modifiable que nous avons évoqué est le **tabagisme**. Comme dit précédemment, le tabagisme a une importance considérable dans l'augmentation du risque d'AVC (accélère la progression de la plaque par plusieurs facteurs biologiques comme la dysfonction endothéliale ou encore la vasoconstriction) (Piepoli et al. 2016). Ainsi, l'arrêt du tabagisme représente le moyen le plus efficace et le plus économique pour diminuer le risque d'AVC (Liapis et al. 2010). En effet, il existe des traitements aidant à l'arrêt du tabagisme, qui ne sont pas des médicaments à proprement parler. Ces traitements interviennent dans la thérapie de remplacement de la nicotine et sont de différentes natures comme des patchs, des gommes à mâcher, des inhalateurs de nicotine, des pastilles ou encore des sprays buccaux et sprays nasaux. Néanmoins, il existe également des médicaments qui aide au sevrage tels que le bupropion (psychotrope) ou encore le varenicline (agoniste des récepteurs nicotiniques du système nerveux central).

Ensuite, le deuxième facteur de risque cardiovasculaire évoqué est **l'hypertension artérielle**. Le contrôle de la pression artérielle est également très important car il a été montré qu'une diminution de la PAS de 2mm Hg pouvait réduire de 25% le risque d'AVC (Sokol et al. 2006). Pour ceci, il existe différents types d'agents antihypertenseurs. Il est donc nécessaire de bien définir la cause de l'hypertension afin de choisir le traitement adéquat (Paraskevas et al. 2016). L'examen principalement utilisé pour déterminer la cause de l'HTA est la mesure du taux de rénine et d'aldostérone plasmatique. Brièvement, la rénine est sécrétée au niveau du rein lorsque la pression dans l'artère rénale diminue, et a pour rôle de cliver l'angiotensinogène en angiotensine I (forme inactive de l'angiotensine II). Ensuite, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) transforme l'angiotensine I en angiotensine II. L'angiotensine II favorise l'hypertension artérielle à la fois par vasoconstriction des artérioles (via la noradrénaline), en favorisant la sécrétion d'aldostérone (maintien de la pression artérielle) par le rein, et en stimulant

la sensation de soif qui entraine de fait une plus grande absorption d'eau et augmente ainsi le volume sanguin et donc la pression artérielle. Ensuite, une fois la cause déterminée, il est plus facile de choisir entre les 4 grands types d'agents antihypertenseurs (Velasco et al. 2013) que sont les bloqueurs des canaux calciques (CCB), les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II (ARB), les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACEis) et les inhibiteurs de la rénine. Alors que les CCB vont intervenir dans la relaxation des CML vasculaires et ainsi limiter la vasoconstriction, les 3 autres types d'agents antihypertenseurs vont agir à différents niveaux de la cascade de régulation endocrinienne et enzymatique qu'est le système rénine-angiotensine-aldostérone, défini précédemment.

Le troisième facteur de risque cardiovasculaire que nous avons évoqué est le **diabète**. La prise en charge du diabète est tout aussi importante que les précédents facteurs de risque CV car c'est une comorbidité qui fait augmenter le risque d'AVC par 1,8 à 6 fois (Piepoli et al. 2016). Son traitement fait également intervenir la prise en charge des facteurs de risque CV, notamment l'obésité et la sédentarité. L'objectif principal du traitement diabétique est le contrôle de l'indice glycémique défini par une cible d'hémoglobine glyquée (HbA1c) inférieure à 7% (HAS, 2013). Il existe 5 types majeurs d'agents hypoglycémiants oraux selon la Haute Autorité de Santé (HAS) : les sulfonylurées (ou sulfamides), les glinides, les biguanides, les thiazolidinediones et les inhibiteurs des alpha glucosidases. Les recommandations de la HAS en janvier 2013 indiquent que la première molécule utilisée, et en monothérapie, est la metformine (biguanide). La metformine permet de diminuer la production hépatique de glucose via une diminution du processus de la néoglucogenèse. Ensuite, la HAS préconise que « l'association metformine + sulfonylurée est la bithérapie à privilégier ». Les sulfonylurées agissent sur les cellules β du pancréas en augmentant leur libération d'insuline. Enfin, la dernière consigne de la HAS est que « l'insuline est le traitement de choix lorsque les traitements oraux et non insuliniques ne permettent pas d'atteindre l'objectif glycémique ».

Ensuite, le quatrième facteur de risque cardiovasculaire auquel nous nous sommes intéressés est la **dyslipidémie**. L'athérogénèse débutant par une accumulation de lipides dans la paroi artérielle, un des objectifs majeurs de la prévention primaire est la réduction du taux de lipides circulants afin de limiter au maximum le développement de plaque. Le traitement s'appuie essentiellement sur deux agents hypolipidémiants : les statines et les antiagrégants plaquettaires. En effet, les statines font partie du traitement basal des patients souffrant de maladies cardiovasculaires. Il a été montré que les statines sont associées à la réduction du taux d'AVC et de la progression du *carotid intima-media thickness* (cIMT), un marqueur précoce de l'athérosclérose (Paraskevas et al. 2016). Il a également été montré que la réduction de 10% du taux de LDL-C entraine une diminution du risque d'AVC de 15,6% (Amarenco et al. 2004). Ces observations soulignent bien l'importance des statines dans la prévention primaire et secondaire de l'AVC. Ainsi, la prise de statines est essentielle et inévitable, et ne peut être stoppée qu'en cas d'effets indésirables (par exemple, rhabdomyolyse), mais son arrêt, même temporaire, est néfaste pour le patient (Tziomalos et al. 2008). Néanmoins, les statines peuvent être couplées à d'autres agents hypolipidémiants afin d'améliorer plus efficacement le profil lipidique. En effet, dans l'essai clinique IMPROVE-IT (Cannon et al. 2015), il a été montré que l'ajout de la molécule ézétimibe (autre agent hypolipidémiant) aux statines était plus efficace dans la réduction de l'occurrence d'AVC ischémique qu'un traitement par statines seules. Bien que les statines soient la molécule hypolipidémiante la plus utilisée, d'autres existent et peuvent être prescrites en cas d'intolérance aux statines : l'ézétimibe, des résines fixatrices des acides biliaires et fibrates ou encore des *cholesterol ester transfer protein inhibitors* et *protein convertase subtilisin/kexin 9 inhibitors*. L'utilisation d'antiagrégants plaquettaires (AAP) fait également partie intégrante du traitement médicamenteux de l'AVC. En effet, les plaquettes interviennent dans le processus d'athérogénèse lors de la formation d'un potentiel thrombus. Ainsi, les AAP servent à inhiber la thrombose et interviennent préférentiellement en prévention secondaire. Les principaux AAP utilisés sont l'aspirine (qui est un inhibiteur de l'enzyme cyclo-oxygénase 1) et le Clopidogrel (qui

est un inhibiteur des récepteurs de l'adénosine diphosphate). Il a été montré que l'aspirine était plus efficace à faible dose qu'à forte dose (Paraskevas et al. 2016), mais que le Clopidogrel permettait une réduction de l'occurrence de l'AVC de 1,7% de plus que l'aspirine (CAPRIE Steering Committee 1996). Cependant, comme pour les agents hypolipidémiants, le traitement le plus efficace réside dans l'association de l'aspirine et du Clopidogrel. En effet, en prévention secondaire, on rapporte une réduction de 32% du risque de récidive d'AVC et pas d'augmentation d'hémorragie, même après 1 an de suivi (Wang et al. 2015). Les effets bénéfiques de cette bithérapie ont également été démontré en cas de sténose artérielle intra- (Wang et al. 2013) et extra-crâniale (Markus et al. 2005), de même que pour la maladie de l'artère coronaire (Bowry et al. 2008).

Enfin, le dernier facteur de risque cardiovasculaire, **l'obésité**, nécessite une attention particulière. En effet, le traitement médicamenteux est quasiment inexistant (Merrouche and Coffin 2005). Il existait un médicament anorexigène, le Rimonabant. Son action était multiple : augmentation du taux de HDL-C sanguin et diminution du taux de triglycérides, augmentation du taux d'adiponectine (amélioration de la sensibilité à l'insuline) et réduction du taux d'hémoglobine glyquée HbA1c (Després et al. 2005). Malgré ces actions plutôt bénéfiques, le médicament a été retiré du marché en 2008 en raison d'effets indésirables psychiatriques, augmentant considérablement le risque de suicide (Christensen et al. 2007). Ainsi, il n'existe pas à l'heure actuelle de médication pour lutter contre l'obésité. Néanmoins, en plus d'un suivi diététique poussé, le traitement proposé aux patients obèses est la chirurgie bariatrique afin de modifier l'absorption des aliments (Paraskevas et al. 2016). Plusieurs types de chirurgies sont proposées aux personnes dont l'IMC est supérieure à 35kg/cm² :

- Anneau gastrique ajustable : *pose d'un anneau autour de la jonction entre l'œsophage et l'estomac*
- Gastrectomie longitudinale : *réduction du volume de l'estomac en retirant les 2/3 gauche de l'estomac*

- By-pass gastrique : *réduction du volume de l'estomac et modification du circuit alimentaire*

d. Traitement par l'Activité Physique

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, la prévention primaire et secondaire de l'athérosclérose et l'AVC repose sur une combinaison entre médication et amélioration du style de vie. Le comportement sédentaire est un des principaux facteurs de risque, il est donc indispensable que l'activité physique soit prise en compte dans le processus thérapeutique de l'athérosclérose. De nombreuses études, dont certaines de très grande ampleur, apportent les preuves que pratiquer une activité physique régulière réduit le risque d'AVC. Récemment, une étude impliquant plus de 3 millions de personnes a démontré que les personnes engagées dans une pratique physique régulière avaient 20% de risque en moins de développer une sténose artérielle (Stein et al. 2015), et plus particulièrement 16% de risque en moins de développer une maladie carotidienne. Il est néanmoins intéressant de constater dans cette étude que 63% de la cohorte était impliqué dans une AP régulière. Stein et ses collaborateurs ont également montré que la fréquence d'activité physique était négativement corrélée à la prévalence de sténose carotidienne. Actuellement, les recommandations de l'OMS sont divisées en 3 catégories d'âge : les enfants (de 5 à 17 ans), les adultes (de 18 à 64 ans) et les seniors (plus de 65 ans) (World Health Organization 2010). Concernant les adultes, « l'activité physique englobe notamment les loisirs, les déplacements (par exemple la marche ou le vélo), les activités professionnelles, les tâches ménagères, les activités ludiques, les sports ou l'exercice planifié, dans le contexte quotidien, familial ou communautaire ». Il est donc recommandé de pratiquer au minimum 150min d'activité d'endurance d'intensité modérée par semaine ou 75min d'activité d'endurance de forte intensité par semaine (correspondant à une quantité de 600MET-min/sem ou équivalents métaboliques). Il est surtout important d'augmenter progressivement la durée d'activité physique par semaine jusqu'à 300min d'AP modérée par semaine (ou 150min d'AP intense) pour des bénéfices supplémentaires. La majorité des patients ayant subi un AVC sont en moyenne âgés

de plus de 65 ans. Donc, pour les seniors, les recommandations de l'OMS sont similaires en termes de durée d'AP modérée ou intense à pratiquer. Cependant, il est précisé que « les personnes âgées dont la mobilité est réduite devraient pratiquer une activité physique visant à améliorer l'équilibre et à prévenir les chutes au moins trois jours par semaine » et que « lorsque des personnes âgées ne peuvent pratiquer la quantité recommandée d'activité physique en raison de leur état de santé, elles devraient être aussi actives physiquement que leurs capacités et leur état le leur permettent ».

A l'heure actuelle, les recommandations faites par l'OMS ne semblent pas être les plus adaptées pour limiter la mortalité cardiovasculaire. En effet, elles ont été remises en question à plusieurs reprises où la quantité de 600 MET-min/sem a été qualifié de non-optimale pour prévenir les maladies cardiovasculaires (Hu et al. 2000 ; Danaei et al. 2009). Ainsi, une récente étude a montré une réduction de la morbidité associée à la maladie de l'artère coronaire lorsque les patients pratiquaient au moins 900MET-min/sem (ou 45min d'AP modérée par jour) (Zhao et al. 2016). Il a également été montré par la suite qu'un niveau d'AP inférieur à 1600MET-min/sem (ou 80min d'AP modérée par jour) contribuait à 29% des décès dus à une cardiopathie ischémique et à 21% des décès dus à un AVC ischémique dans une cohorte de près de 25 000 sujets (Poggio et al. 2017). Enfin, une récente méta-analyse concernant la relation dose-réponse entre le niveau d'AP et le risque de développer une maladie grave (telle que des cancers du poumon ou du colon, du diabète, des maladies cardiaques ischémiques ou AVC) a montré que pratiquer de hauts niveaux d'AP était associé à un risque plus faible de maladie grave (Kyu et al. 2016). Plus particulièrement, cette méta-analyse a permis de montrer que les meilleurs bénéfices pour limiter les cardiopathies ischémiques se produisent lorsque le sujet pratique 3000-4000MET-min/sem (ou plus de 150min d'AP modérée par jour).

La sédentarité est un facteur de risque à part entière à combattre par la pratique d'une AP régulière (ou chronique). Mais l'activité physique est bénéfique pour la lutte de tous les autres facteurs de risque cardiovasculaires mentionnés. En effet, l'AP est bénéfique pour le contrôle de

la pression artérielle. Ce bénéfice peut être expliqué par différentes hypothèses telles que l'amélioration de la vasodilatation endothéliale (Higashi and Yoshizumi 2004), la diminution des résistances périphériques de l'artère (Martin et al. 1991) ou encore une amélioration des paramètres de compliance carotidienne (Tanaka et al. 2000).

Concernant l'arrêt du tabagisme, l'activité physique joue un rôle à deux niveaux différents. En premier lieu, elle permet de réduire les symptômes du sevrage tabagique (Ussher et al. 2001), qui poussent les sujets à la reprise (tension, irritabilité, stress, troubles de la concentration et du sommeil, et pulsion de fumer). En second lieu, l'activité physique permet de contrôler la prise de poids engendrée par l'arrêt du tabagisme, à court terme (Marcus et al. 1999) ainsi qu'à long terme (Farley et al. 2012).

Concernant le contrôle du diabète, l'activité physique est également primordiale. En effet, une pratique physique régulière permet le contrôle du poids mais également de l'indice glycémique, à la fois par une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une diminution du pic hyperglycémique post-prandial et du besoin en insuline (Mercier et al. 1999). De plus, pendant l'activité physique, les muscles sollicités consomment du glucose, ce qui permet une régulation directe de la glycémie pendant la pratique physique et pendant quelques heures après l'exercice physique.

Les dyslipidémies sont définies par plusieurs paramètres distincts, notamment une concentration de LDL-C trop élevée ou une concentration de HDL-C trop faible, en plus des taux de cholestérol totaux et triglycérides anormaux. L'activité physique a été montrée pour avoir des effets bénéfiques sur l'ensemble de ces paramètres, et ainsi améliorer le profil lipidique. Dans son étude, Kraus et al. (2002) a pu démontrer après 6 mois d'AP régulière chez des sujets en surcharge pondérale, une diminution du taux de LDL-C et de TG ainsi qu'une amélioration du taux de HDL-C. Il est également à noter que ces changements étaient proportionnels au niveau

d'AP réalisée, et que même une activité modérée induisait des améliorations du profil lipidique (Kraus et al. 2002). Cependant, l'AP n'eut pas d'effet sur le taux de cholestérol total.

Enfin, le dernier facteur de risque cardiovasculaire est l'obésité. Le lien entre l'activité physique et la perte de poids a largement été décrit. En effet, l'AP régulière permet de consommer lipides et glucides qui lors d'obésité s'accumulent considérablement. Ainsi, l'activité physique induit un changement de composition corporelle et également une répartition différente des graisses dans le corps. De plus, une pratique physique régulière à long-terme va permettre aux patients de prévenir la reprise de poids post-amaigrissement, et donc jouera un rôle également lors de la prévention secondaire (Duclos et al. 2010). Néanmoins, il apparait clairement que l'association d'une activité physique régulière et d'une intervention diététique parallèle permet une perte de poids supérieure (perte de poids 5 fois supérieure au groupe exercice seul pour Messier et al. 2000). De la même manière, Villareal et al. (2011) ont montré que l'association d'une activité physique régulière et d'une intervention diététique permettait une perte de poids d'environ 10% alors que l'activité physique seule ne permettait pas de perte de poids après une intervention de 52 semaines. Ces deux dernières études démontrent ainsi l'importance d'adopter un mode de vie sain, et ne pas se focaliser uniquement sur un paramètre.

CHAPITRE 2 : MECANISMES D'INSTABILITE/VULNERABILITE ET DE RUPTURE DE LA PLAQUE D'ATHEROSCLEROSE CAROTIDIENNE

La gravité de l'athérosclérose est principalement due au caractère instable de la plaque conduisant à un risque élevé de survenue d'accident aigu ischémique (AVC ou AIT). Cette vulnérabilité, que l'on peut caractériser comme l'évolution d'une plaque stable (ou peu avancée) à une plaque instable (ou compliquée), fait intervenir différents facteurs.

1. Chape fibreuse

De nombreuses études ont relié le concept de vulnérabilité à la composition anatomique de la plaque (Fayad and Fuster 2001; Badimon and Vilahur 2014). Il apparait tout d'abord, que les proportions relatives de lipides et de tissu fibreux jouent un rôle important. En effet, une plaque comportant un cœur lipidique important mais une chape fibreuse fine est considérée comme étant à fort risque de rupture. A l'inverse, une plaque comportant un cœur lipidique de moindre taille séparé par une chape fibreuse épaisse ne présente que peu de risque de rupture (Mughal et al. 2011). Ainsi, l'épaisseur de la chape fibreuse est un paramètre essentiel dans le processus de déstabilisation. Deux mécanismes distincts en permettent sa modulation : la production de matrice extracellulaire, qui assure la solidité de la chape fibreuse, et sa dégradation.

Les cellules musculaires lisses, qui ont migré et proliféré dans l'intima, contribuent à l'épaississement et la consolidation de la chape fibreuse en produisant de la matrice extracellulaire, en particulier de l'élastine et du collagène (Silvestre-Roig et al. 2014). Plusieurs cytokines sont à l'origine de cette régulation de collagène par les CML comme le TGFβ (transforming growth factor bêta) qui semble induire sa production (Gisterå et al. 2013) alors que l'IFN-γ (interféron gamma) l'inhiberait (Koga et al. 2007). Ainsi, l'augmentation de production d'IFN- γ par les lymphocytes T pourrait augmenter le risque de rupture. D'autres molécules

participent à la dégradation de MEC dans la plaque d'athérosclérose, notamment les métalloprotéases (Gough et al. 2006a). Elles sont principalement secrétées par les macrophages, montrés pour être plus présents dans les lésions symptomatiques que dans les lésions asymptomatiques (Golledge et al. 2000 ; Moore and Tabas 2011). Ces différentes observations soutiennent l'idée du rôle potentiel de l'inflammation dans l'amincissement de la chape fibreuse conduisant à la rupture de plaque. De plus, il a été montré que la présence de cellules inflammatoires dans la chape fibreuse induisait l'apoptose de CML (Silvestre-Roig et al. 2014). L'apoptose de CML induit la réduction de production de protéines de MEC et provoque l'augmentation de l'inflammation, créant ainsi un cercle vicieux.

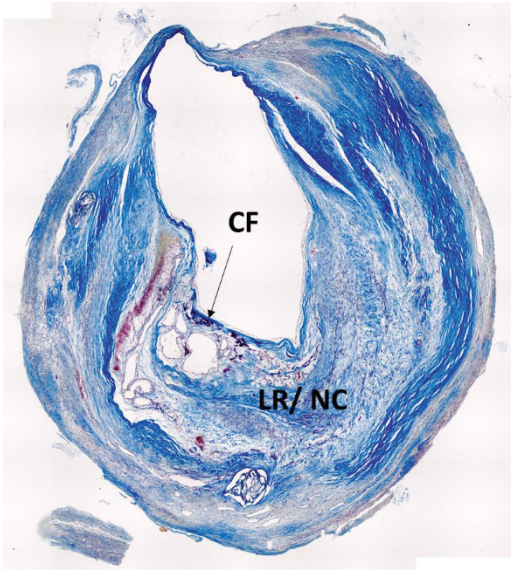


Figure 16. ***Plaque d'athérosclérose carotidienne avancée présentant une chape fibreuse fine (CF) et un cœur nécrotique riche en lipides large (LR/NC)*** colorée au Trichrome de Masson (grossissement x5)

2. Cœur nécrotique riche en lipides

La présence d'un large cœur nécrotique riche en lipides (LR/NC) représente un des principaux facteurs d'instabilité. L'association entre la présence de LR/NC et la survenue d'accidents ischémiques a été étudié à plusieurs reprises, notamment chez des patients présentant une sténose carotidienne asymptomatique (Takaya et al. 2006 ; Hyafil et al. 2014). Dans une majorité des lésions avancées, le cœur nécrotique représente plus de 50% de l'ensemble de la plaque. Il

est généralement composé de cristaux de cholestérol, de cholestérol libre ainsi que d'esters de cholestérol dérivés des lipides (Shah 2007). Son développement dépend probablement de l'apoptose ou la nécrose de macrophages (en particulier de macrophages spumeux) et de lymphocytes T (Libby and Hansson 2015). En effet, il a été montré qu'une quantité importante de cholestérol libre dans la plaque pouvait conduire à l'apoptose de macrophages, par l'intermédiaire de caspases (Shah 2007). Néanmoins, l'augmentation de volume du LR/NC peut également être due à l'activation de macrophages et le taux de cholestérol mais aussi à une hémorragie intraplaque (Takaya et al. 2005). Dans ce contexte, une forte concentration de ROS joue probablement un rôle important dans le développement du LR/NC en induisant l'oxydation des membranes cellulaires et des LDLox, et ainsi conduire à la nécrose cellulaire et par la suite, l'induction d'inflammation ainsi que le recrutement de macrophages (Martinet et al. 2011).

3. Hémorragie intraplaque

La présence d'une hémorragie intraplaque (IPH) apparait, à l'heure actuelle, comme étant le facteur d'instabilité de la plaque le plus déterminant. En effet, l'association entre la présence d'une IPH et la survenue d'évènements ischémiques a été bien étudié (Takaya et al. 2005, 2006 ; Gao et al. 2007 ; Turc et al. 2012). L'hémorragie intraplaque accentue la vulnérabilité de la plaque par l'augmentation du volume du cœur lipidique et ainsi l'augmentation du volume de la plaque dans sa globalité (Takaya et al. 2005). En effet, l'hémorragie entraine une accumulation d'érythrocytes dans le cœur lipidique/nécrotique, qui vont alors libérer à la fois de l'hémoglobine et du fer. Ce relargage d'hème et de fer aura alors pour conséquence la génération de ROS d'une réactivité accrue (via la réaction de Fenton) dans le cœur lipidique/nécrotique. Ce stress oxydant, induit par l'IPH, provoque l'attraction de neutrophiles dans le cœur lipidique qui, à son tour, amplifie la génération de stress oxydant via l'activation de la NADPH oxydase et des myélopéroxydases (MPO) (Michel et al. 2011a), formant ainsi un cercle vicieux entre IPH, stress oxydant et inflammation. L'hémorragie entraine également un efflux de cristaux de cholestérol (Chistiakov et al. 2015), qui va favoriser la rupture des membranes biologiques et induire l'érosion

de la chape fibreuse (Abela and Aziz 2006). En plus de la libération d'hémoglobine et de fer observée, l'IPH induit la sécrétion de molécules entrainant la phagocytose de globules rouges et de fer. Le processus de phagocytose engendre alors l'activation plaquettaire et de thrombine, et la formation de fibrine participant à l'expansion de cœur lipidique/nécrotique (Michel et al. 2011a).

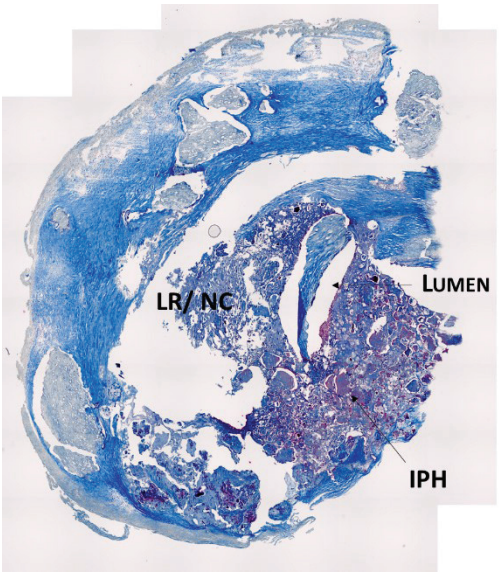


Figure 17. ***Plaque d'athérosclérose carotidienne avancée présentant une sténose serrée (> 90%), un cœur nécrotique riche en lipides large (LR/NC) et une hémorragie intraplaque importante (IPH)***
colorée au Trichrome de Masson (grossissement x5)

4. Néovascularisation

Plusieurs facteurs peuvent induire l'hémorragie intraplaque, mais il semblerait que la fissure et le saignement de néovaisseaux immatures en soit mécaniquement l'origine (Virmani et al. 2005). En effet, environ 80% du réseau de *vasa vasorum* (petits vaisseaux de l'adventice vascularisant l'adventice et les 2/3 externes de la media) dans la plaque présentent une certaine fragilité et susceptibilité à la fissure (Sluimer et al. 2009). Ces néovaisseaux sont alors décrits comme immatures du fait de leur couche de cellules musculaires lisses désorganisées et de leurs jonctions endothéliales non-étanches (Dunmore et al. 2007). L'immaturité des néovaisseaux serait directement impliquée dans l'extravasation leucocytaire et érythrocytaire car il a été montré que les néovaisseaux exprimaient à leur surface des molécules d'adhérence telles que VCAM-1 et que l'intensité de l'expression de ces molécules était corrélée à l'intensité de la réponse

inflammatoire systémique (Cid et al. 2000). L'induction de la néoangiogénèse pourrait être favorisée par l'état hypoxique, oxydatif et inflammatoire de la plaque (Dunmore et al. 2007 ; Sluimer et al. 2008 ; Pelisek et al. 2012 ; Chistiakov et al. 2015). En effet, ces différentes études ont démontré la présence du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) dans les plaques d'athérosclérose symptomatiques. VEGF a pour rôle d'activer la formation de néovaisseaux (Ferrara 2009), notamment par l'intermédiaire de la protéine HIF-1α (Forsythe et al. 1996). Plusieurs sources indépendantes de l'hypoxie ont été reportées pour stabiliser la protéine. Parmi ces sources, les macrophages (Dunmore et al. 2007 ; Sluimer et al. 2008), les ROS (Brunelle et al. 2005) et les LDLox (Hutter et al. 2013) ont été montré pour inhiber la dégradation de HIF-1α et donc augmenter son contenu nucléaire. Par conséquent, l'inflammation et le stress oxydant sont deux processus majeurs engendrant la néoangiogénèse et favorisant ainsi la vulnérabilité de la plaque.

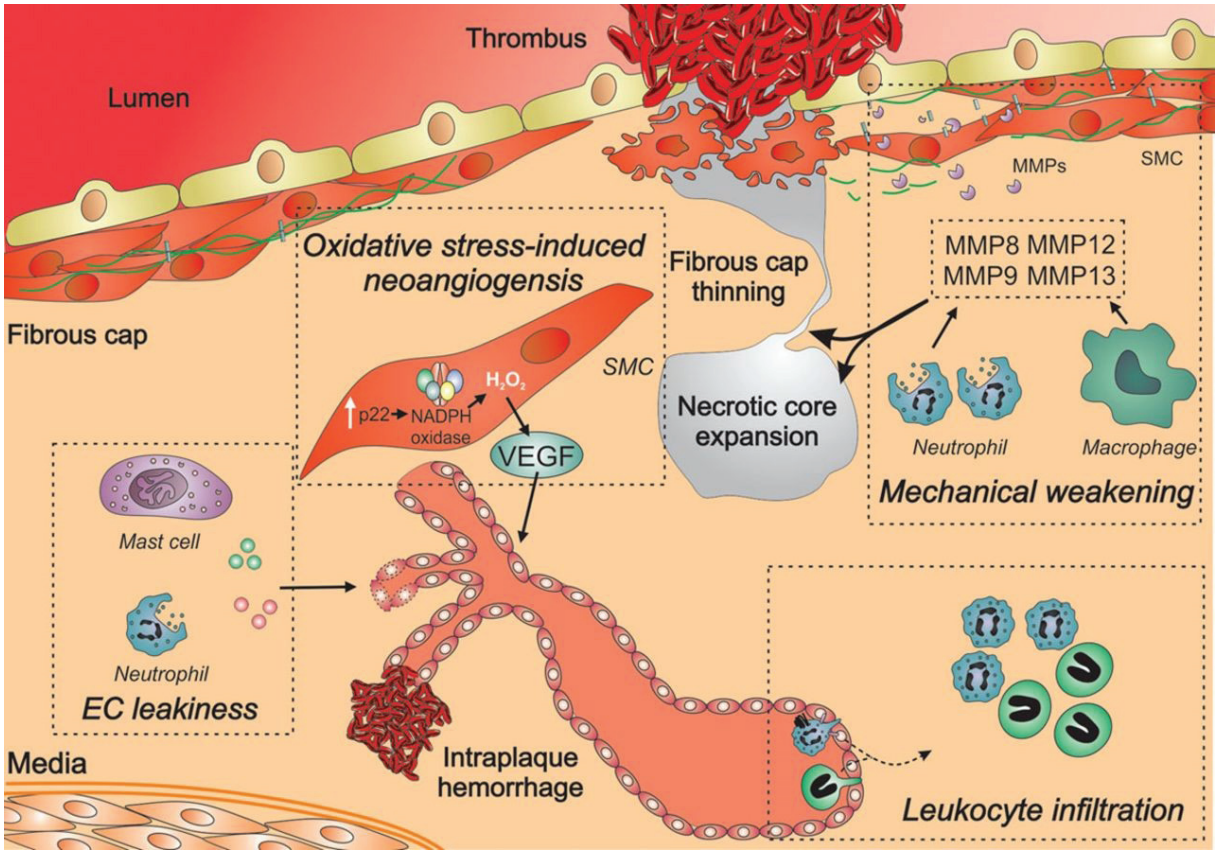


Figure 18. ***Facteurs d'instabilité/vulnérabilité de la plaque d'athérosclérose***
d'après Silvestre-Roig et al., Circulation Research 2014

5. Contraintes de cisaillement (ou shear stress)

Il a récemment été rapporté qu'uniquement 5% des plaques à fort risque de rupture (avec une chape fibreuse fine recouvrant un fibro-athérome) étaient associées à une réelle rupture et que des facteurs mécaniques étaient probablement impliqués dans les processus de déstabilisation (Pedrigi et al. 2014). Les plaques d'athérosclérose se développent au niveau des embranchements artériels (aortiques, carotidiens, coronariens, fémoraux), sites où le flux sanguin est perturbé et les contraintes de cisaillement (ou shear stress : force du flux sanguin exercée sur les cellules endothéliales artérielles) sont complexes. La direction et la durée moyenne de la contrainte de cisaillement endothéliale sont connues pour soit accélérer soit ralentir la progression de la plaque d'athérosclérose (Li et al. 2014a). En effet, alors qu'un shear stress laminaire est plutôt anti-athérosclérotique, un shear stress oscillant, faible ou fort est plutôt pro-athérosclérotique.

Un shear stress faible a été montré, chez l'animal, pour moduler l'inflammation locale et ainsi limiter l'amincissement de la chape fibreuse, processus directement impliqué dans la rupture ou l'érosion de la plaque (Cheng et al. 2006). Au contraire, un shear stress fort participe plutôt à la déstabilisation de la plaque (Kwak et al. 2014), en particulier en réduisant la taille de la chape fibreuse par l'intermédiaire de l'activation des MMP (Tronc et al. 2000). De plus, Cicha et al. (2011) précisent que la région de la plaque la plus exposée aux contraintes de cisaillement, composée de macrophages, lipides, hémorragie intraplaque et d'une fine chape fibreuse, est la plus à risque de rupture (2011), soit l'ensemble des facteurs d'instabilité précédemment évoqués. En effet, en aval de la sténose, on observe des contraintes de cisaillement plus faibles qu'en amont de celle-ci (Li et al. 2014a). De plus, il a été montré que l'épaisseur de la chape fibreuse avait une certaine importance dans l'occurrence de la force des contraintes de cisaillement (Loree et al. 1992). En effet, il apparait que l'amincissement de la chape fibreuse, induit par l'action des protéases sur les macrophages, peut sérieusement augmenter la contrainte circonférentielle maximale.

CHAPITRE 3 : STRESS OXYDANT ET PROCESSUS INFLAMMATOIRES : ROLE DANS L'ATHEROGENESE

A. STRESS OXYDANT

L'athérosclérose est une pathologie vasculaire complexe où les mécanismes du stress oxydant et de l'inflammation jouent un rôle prépondérant, que ce soit dans l'initiation ou dans la progression de la plaque. En effet, ces deux mécanismes physiopathologiques agissent en synergie et forment un cercle vicieux, à l'origine des symptômes ischémiques tels que l'AVC.

1. Définition : balance pro/antioxydants

Le stress oxydant est défini comme étant un déséquilibre entre molécules pro-oxydantes et molécules antioxydantes (Sies 1997). Ainsi, lorsque la production de pro-oxydants (i.e. d'espèces réactives de l'oxygène : ROS) dépasse les capacités de défense antioxydante de notre organisme, nos cellules et nos tissus subissent des dommages irréversibles. En effet, l'oxydation produite par les ROS en excès peut atteindre des macromolécules lipidiques (Gutteridge and Halliwell 1990), protéiques (Stadtman 1992) ainsi que l'ADN (Henle et al. 1996). Il résulte de la répétition de ces attaques des dommages cellulaires et tissulaires, une stimulation des processus inflammatoires ou encore des anomalies d'expression génique. Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies (Favier 2006), en particulier dans des pathologies cardiovasculaires (Dhalla et al. 2000). Cependant, en quantité modérée, les ROS jouent un rôle physiologique notamment dans les processus de phagocytose (Favier 2006) ou dans les processus de signalisation cellulaire (Sen and Packer 1996) où ils agissent comme messagers cellulaires ou en modifiant le statut rédox intracellulaire. Le stress oxydant peut être produit lors de conditions physiologiques comme l'activité physique (Fisher-Wellman and Bloomer 2009) ou encore en situation d'hypoxie (Pialoux et al. 2006).

2. Pro-oxydants

a. Espèces réactives de l'oxygène

Les radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) forment la classe des pro-oxydants. Les radicaux libres (RL) sont des molécules très réactives qui présentent un électron libre sur leur dernière couche de valence (ou orbitale). Afin de retrouver son état de stabilité, l'électron célibataire va chercher à s'associer à un second électron. Dans le but de former une nouvelle molécule électriquement stable, le radical libre va soit céder son électron libre à un autre radical libre (réduction) soit arracher l'électron d'un autre radical libre (oxydation), provoquant ainsi une réaction en chaîne radicalaire. L'oxygène que nous respirons (O_2) est une molécule composée de deux électrons non-appariés sur sa dernière couche de valence. Ainsi, il peut être considéré comme radical libre, à l'origine des ROS du fait de ses propriétés d'accepteur d'électrons. Lors de la respiration cellulaire, dans la chaîne de transport d'électrons, différents radicaux libres vont être produits : l'anion superoxyde $O_2^{\circ -}$, le radical hydroxyle $OH^{\circ -}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2. En effet, lors de la respiration cellulaire qui réduit l'O_2 en H_2O, une petite quantité d'électrons va s'échapper de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale et va réduire l'O_2 (Leeuwenburgh and Heinecke 2001). De plus, l'anion superoxyde peut former un autre radical libre en s'associant avec le monoxyde d'azote (NO), l'ion peroxynitrite $ONOO^{\circ -}$. On estime que la production de ces différents ROS correspond à 1 à 5% de l'O_2 consommé au repos lors de la respiration (Leeuwenburgh and Heinecke 2001).

b. Sources de ROS

La principale source de ROS est la **chaîne respiratoire mitochondriale**. En effet, la fuite d'électrons survenue au niveau des complexes I et III (ou coenzyme Q10) va entrainer la réduction de l'O_2 et la formation d'anion superoxyde $O_2^{\circ -}$ par l'équation suivante :

$$(1)\ O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\circ -}$$

Alors que seulement 1 à 5% de l'O_2 inspiré est réduit en anion superoxyde en condition basale, on observe une forte augmentation de la consommation d'oxygène en cas d'activité physique, et de fait une augmentation de la fuite des électrons (Davies et al. 1982). De la même manière, en situation d'hypoxie/réoxygénation, une augmentation de la fuite des électrons est observée, augmentant ainsi la production radicalaire (Li and Jackson 2002).

L'anion superoxyde possède une demi-vie extrêmement courte, notamment en solution aqueuse. Cette instabilité est basée sur sa capacité de dismutation (réaction chimique où une espèce joue le rôle d'oxydant et le rôle de réducteur) en H_2O_2 (Yu 1994). Cette réaction est spontanée mais peut également être accélérée 10 000 fois sous l'action de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). De plus, l'anion superoxyde peut réagir avec le NO pour former l'ion peroxynitrite $ONOO^-$, un composé toxique du métabolisme du NO.

$$(2)\ O_2^{\circ -} + O_2^{\circ -} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé n'est pas un RL à proprement parler car il ne possède pas d'électron libre sur son orbitale, mais est extrêmement toxique pour la cellule. En effet, il possède un fort pouvoir oxydant et des capacités de diffusion facilitée à travers les membranes biologiques. Ces propriétés, en plus de sa faible réactivité, lui permettent d'agir à très grande distance de son lieu de synthèse. De plus, en présence de métaux de transition sous forme réduite, tels que l'ion fer Fe^{2+} ou l'ion cuivre Cu^{2+}, H_2O_2 peut engendrer la formation du radical libre très toxique et réactif OH°, via la réaction de Fenton :

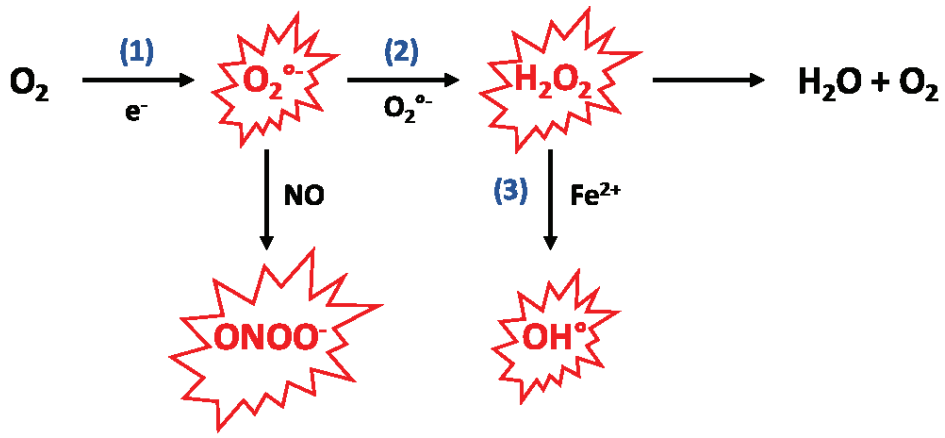
$$(3)\ H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^\circ + OH^- + Fe^{3+}$$

L'ion hydroxyle OH° est le radical libre le plus réactif, capable d'attaquer de nombreuses molécules telles que les lipides, les protéines, les glucides, les métaux ou encore l'ADN (Halliwell and Gutteridge 1984).

Il est à noter que l'ion ferrique Fe^{3+} ainsi produit, peut être à son tour oxydé par l'anion superoxyde, présent dans la mitochondrie, et former de l'O_2 et des ions Fe^{2+} et ainsi entretenir la

réaction de Fenton. Ceci forme ainsi le cycle d'Haber-Weiss (Haber and Weiss 1934) dont l'équation bilan peut être simplifiée ainsi (Halliwell and Gutteridge 1984) :

(4) $H_2O_2 + O_2^{\circ-} \rightarrow OH^\circ + OH^- + O_2$



(1) $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\circ-}$ *(réduction de l'oxygène moléculaire)*

(2) $O_2^{\circ-} + O_2^{\circ-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$ *(dismutation de l'anion superoxyde)*

(3) $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^\circ + OH^- + Fe^{3+}$ *(réaction de Fenton)*

(1) + (2) + (3) = (4) $H_2O_2 + O_2^{\circ-} \rightarrow OH^\circ + OH^- + O_2$ *(cycle de Haber-Weiss)*

Figure 19. ***Sources des ROS endogènes et formation des différents types de radicaux libres***

Cependant, il existe d'autres sources de formation de ROS que via la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. Les trois voies secondaires de production de ROS dont nous parlerons sont la voie de la xanthine oxydase, la voie de la NADPH oxydase et la voie de la NO Synthase endothéliale découplée.

La **xanthine oxydase** (ou XO) est une enzyme qui a pour rôle de catalyser la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique, en condition de forte demande en ATP et de déficit en oxygène. En situation d'hypoxie ou d'ischémie-reperfusion, la xanthine oxydase peut catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique. Lors de ces situations, l'adénosine triphosphate (ATP) est transformée en adénosine diphosphate (ADP) puis en adénosine monophosphate (AMP). Puis, l'AMP est convertie en hypoxanthine et xanthine, activant ainsi la xanthine oxydase (Szocs 2004).

En phase de reperfusion (ou réoxygénation), la xanthine oxydase catalyse la réaction suivante (McKelvey et al. 1988), impliquant l'oxygène comme accepteur d'électrons et ainsi la formation d'anion superoxyde :

$$\text{Xanthine} + 2\ O_2 + H_2O \rightarrow \text{Acide urique} + 2\ O_2^{\circ -} + 2\ H^+$$

Ainsi, cette voie de production de ROS est très pertinente dans le contexte de la plaque d'athérosclérose (Förstermann et al. 2017), où des phénomènes d'hypoxie et d'ischémie/reperfusion se produisent dans la plaque. Aussi, la xanthine oxydase est présente dans la paroi vasculaire, de même que le système NADPH oxydase, et a été montré comme étant la source principale de ROS dans l'endothélium vasculaire.

La **NADPH oxydase** (ou NOX) est une enzyme qui a pour rôle de catalyser la réaction d'oxydation du NADPH par l'O_2 et ainsi former l'anion superoxyde.

$$2\ O_2 + \text{NADPH} \rightarrow 2\ O_2^{\circ -} + \text{NADP}^+ + H^+$$

L'isoforme NOX-2 est d'une importance capitale dans la réponse immunitaire et la lutte contre les micro-organismes puisqu'elle est présente dans la membrane plasmique des phagocytes (monocytes/macrophages en particulier). L'inflammation étant un des processus majeurs de l'athérogénèse, notamment via les macrophages, cette voie de production de ROS est également très pertinente. De plus, il semblerait que les isoformes NOX-1 et NOX-3 soient également impliquées dans l'athérogénèse du fait de leur présence dans les cellules endothéliales et dans les CML (Förstermann et al. 2017).

La **NOS endothéliale** (ou eNOS) est la principale enzyme produisant le monoxyde d'azote, située au niveau des cellules endothéliales. En conditions physiologiques, cette enzyme joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie vasculaire, NO permettant la relaxation des CML, et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et des molécules d'adhérence vasculaire (Förstermann and Sessa 2012). Néanmoins, en conditions pathologiques, eNOS peut produire

l'ion superoxyde, c'est le cas lorsque eNOS est découplée (Förstermann and Sessa 2012) (Figure 20).

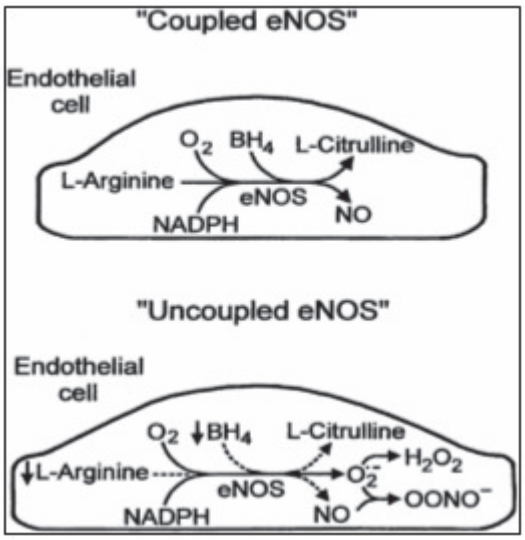


Figure 20. ***Découplage de la NO Synthase endothéliale conduisant à la formation de ROS***

Cette voie de production radicalaire est également pertinente dans le contexte de l'athérosclérose. En effet, il a été montré qu'une mise en contact entre des cellules endothéliales et des LDL provoquait le découplage de eNOS (Stepp et al. 2002). Les LDL et LDLox ont été montré pour induire la production de nitrotyrosine (via notamment NADPH oxydase) pouvant oxyder BH_4, cofacteur de eNOS. L'oxydation de BH_4 induit sa déficience provoquant alors le découplage de eNOS et la production d'ion superoxyde (Li and Förstermann 2013).

Cette liste des sources de ROS n'est pas exhaustive. Il existe également d'autres voies de production radicalaire qui semblent moins majeures dans le cas de l'athérosclérose comme les voies de la cyclooxygénase, de la lipoxygénase ou encore du cytochrome P450.

c. Marqueurs du stress oxydant dans l'athérosclérose

L'extrême réactivité (jusqu'à 10^{-9} secondes) qui caractérise les radicaux libres en font des molécules qui sont très difficilement dosables directement, *in vivo*. L'analyse indirecte des molécules biologiques oxydées est néanmoins une option de choix qui permet une analyse du

stress oxydant. Plusieurs biomarqueurs ont été identifiés dans la littérature pour discriminer les patients atteints d'athérosclérose.

Plusieurs études ont montré un niveau de MDA plasmatique plus élevé chez les patients présentant des lésions d'athérosclérose (Ungurianu et al. 2017). Plus particulièrement, une récente étude démontra des niveaux de MDA plasmatiques plus élevés au niveau du site le plus atteint de la lésion qu'en périphérie (Tsiantoulas et al. 2015).

Des taux élevés d'AOPP plasmatiques ont également été rapportés chez des patients de la maladie coronarienne (Kaneda et al. 2002). De manière intéressante, il a été aussi montré une corrélation entre les AOPP et les niveaux de fibrinogène, qui est lui impliqué dans des processus inflammatoires, de coagulation et de fait dans l'athérogénèse (Selmeci et al. 2006).

La sous-unité $gp91^{phox}$ de la NADPH oxydase (ou NOX2), essentielle à l'activation de la protéine (Babior et al. 2002) a été montré pour être surexprimée dans les plaques d'athérosclérose et associée à une surproduction de ROS (Khatri et al. 2004). De plus, une association entre la surexpression de NOX2 et une FMD altérée chez différents types de patients à risque cardio-vasculaire, suggérant que la surexpression de NOX participe à la vasoconstriction (Del Ben et al. 2012; Loffredo et al. 2012).

Les myéloperoxydases (ou MPO) sont des enzymes catalysant la production de l'acide hypochloreux à partir de H2O2 afin de dégrader des bactéries phagocytées. Ainsi, une augmentation de MPO est un marqueur de l'inflammation mais participe à la progression de la plaque en oxydant des LDL et inactivant la biodisponibilité du NO (Carr et al. 2000). De plus, Exner et al. (2006) ont démontré que le taux de MPO était prédicteur de la progression de plaque carotidienne chez des patients avec un faible niveau de HDL.

Enfin, des niveaux supérieurs de produits avancés de la glycation (ou AGE), composés formés à la suite de l'interaction entre des protéines tissulaires et du glucose, ont été trouvé chez des

patients souffrant de sténose carotidienne. De plus, une surexpression de récepteurs aux AGE ont été associés à des plaques carotidiennes vulnérables (Cipollone et al. 2003).

3. Défenses antioxydantes

La formation de ROS est un processus physiologique, qui devient pathologique et néfaste quand la quantité de ROS dépasse les capacités de défenses antioxydantes. Par définition, l'antioxydant est une molécule possédant un pouvoir réducteur qui limite ou inhibe l'oxydation d'autres molécules, et ainsi retarde ou empêche les dommages délétères des ROS sur nos cellules et nos tissus. Il existe plusieurs types d'antioxydants qui luttent contre la production excessive de ROS. Certains sont produits au cours du métabolisme (source endogène), comme les enzymes antioxydantes alors que d'autres sont obtenus à partir de l'alimentation (source exogène), comme les antioxydants non-enzymatiques.

a. Antioxydants non-enzymatiques

Le premier système de défense est le système des antioxydants non-enzymatiques. Il existe une grande variété d'antioxydants non-enzymatiques endogènes mais leur quantité n'est pas suffisante pour tamponner efficacement la production excessive de ROS. Il est donc nécessaire de combler ce déficit d'antioxydants non-enzymatiques par l'alimentation (Carocho and Ferreira 2013). Les principaux antioxydants non-enzymatiques sont l'acide urique, le glutathion, la vitamine C (ou acide ascorbique), la vitamine E (ou tocophérol) ou encore les précurseurs de la vitamine A (les caroténoides : α- et β-carotène, lycopène, lutéine, zéaxanthine, astaxanthine, canthaxanthine).

L'acide urique est une molécule hydrosoluble et un déchet métabolique qui provient de l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine par la xanthine oxydase. Cette réaction se produit particulièrement en situation d'hypoxie ou d'ischémie/reperfusion. L'acide urique joue un rôle réducteur important dans le plasma, les globules rouges et les leucocytes. Il a la capacité de réduire le l'ion hydroxyle OH° en s'oxydant en allantoïne, un radical uréique stable. Néanmoins,

il apparait que l'acide urique provoque plus d'actions néfastes que bénéfiques. En effet, il est reconnu comme étant un facteur de risque précoce de l'athérosclérose (Kushiyama et al. 2016), notamment en accentuant l'inflammation chronique.

Le glutathion (GSH) est un tripeptide de faible poids moléculaire composé de 3 acides aminés : la cystéine, l'acide glutamique et la glycine. Le glutathion existe sous deux formes différentes, la forme oxydée (GSSG) et la forme réduite (GSH). Il représente le principal antioxydant cytosolique, et agit comme cofacteur de l'enzyme glutathion peroxydase (GPx). Son rôle principal est donc de réduire H_2O_2, mais il peut également agir comme piégeur de ROS, notamment de l'ion hydroxyle OH°, et aider au recyclage des formes oxydées de la vitamine C (Clarkson and Thompson 2000).

La vitamine C (ou acide ascorbique) est un antioxydant hydrosoluble apporté par l'alimentation (citron, jus de fruits et légumes frais). Son rôle antioxydant réside dans l'apport d'ion hydrogène aux radicaux libres OH° et $O_2^{\circ-}$ pour les transformer en H_2O. Il possède également la capacité de recycler la vitamine E sous sa forme réduite.

La vitamine E (ou tocophérol) est le principal antioxydant membranaire lipophile, provenant également de l'alimentation (huiles végétales). La forme la plus active est l'α-tocophérol dont le rôle est de prévenir l'oxydation des acides gras polyinsaturés des phospholipides. On la retrouve principalement dans les membranes biologiques, où elle va piéger les radicaux peroxyles (ROO°) et alcoxyles (RO°) produits au cours de la peroxydation lipidique.

Enfin, le β-carotène, précurseur caroténoïde majeur de la vitamine A, est un antioxydant présent dans les membranes cellulaires qui provient également de l'alimentation (fruits et légumes). Son action est similaire à celle de la vitamine E sur les radicaux peroxyles ROO° (Clarkson and Thompson 2000).

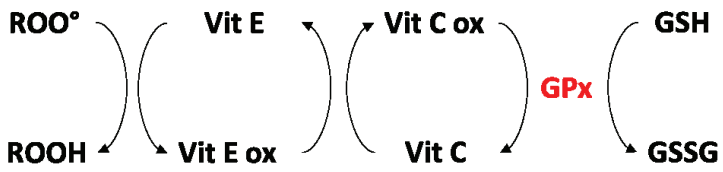


Figure 21. ***Action synergique des antioxydants non-enzymatiques***
ROO°, radical peroxyle oxydé ; ROOH, radical peroxyle réduit ; Vit E, vitamine E ; Vit E ox, vitamine E oxydée ; Vit C, vitamine C ; Vit C ox, vitamine C oxydée ; GPx, glutathion peroxydase ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé.

b. Antioxydants enzymatiques

Le second système de défense de l'organisme contre l'excès de ROS est le système des antioxydants enzymatiques. Ce système est composé majoritairement de trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes sont présentes naturellement dans notre organisme, et agissent de manière indépendante mais sont complémentaires les unes des autres. Chaque enzyme a son lieu, son mode d'action et sa cible spécifique.

Tout d'abord, la SOD est une métalloprotéine dont la fonction est de catalyser la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ en H_2O_2 et O_2. Il existe trois isoformes de la SOD, selon le métal contenu dans son site actif : la SOD1 (CuZn-SOD) se situe au niveau du cytoplasme des cellules et son noyau est composé de cuivre et zinc. La SOD3 possède également un noyau composé de cuivre et zinc mais est extracellulaire (EC-SOD). Elle agit au niveau du plasma et du liquide interstitiel. La SOD2 (Mn-SOD) est quant à elle située dans les mitochondries et son noyau est composé de manganèse. Elle est produite consécutivement à une surproduction de ROS alors que SOD1 et SOD3 sont produites continuellement dans la cellule. Les SOD sont d'une importance primordiale puisqu'elles stoppent les réactions en chaine d'$O_2^{\circ-}$ et limitent ainsi le cycle d'Haber-Weiss et la production d'OH° (Figure 21).

La catalase est une enzyme située dans le peroxysome des cellules, en particulier dans les hématies, des hépatocytes et des cellules rénales. La fonction de la catalase est d'accélérer la dismutation de H_2O_2 en H_2O et O_2. La réaction de dismutation signifie qu'une molécule est utilisée

comme oxydant et la deuxième comme réducteur, ne nécessitant donc pas l'utilisation d'un accepteur d'électron. La catalase est également importante puisqu'elle permet de limiter la réaction de Fenton et donc limiter la production de OH° (Figure 21).

La glutathion peroxydase est une enzyme tétramérique est dite sélénium-dépendante du fait de son site actif contenant le sélénium, la sélénocystéine. Son rôle est d'inhiber la formation de OH° et RO° par réduction de H_2O_2. Pour réaliser cette réaction, le glutathion réduit est utilisé comme accepteur d'électrons. De plus, une enzyme complémentaire intervient dans la réaction afin de recycler le glutathion oxydé, la glutathion réductase.

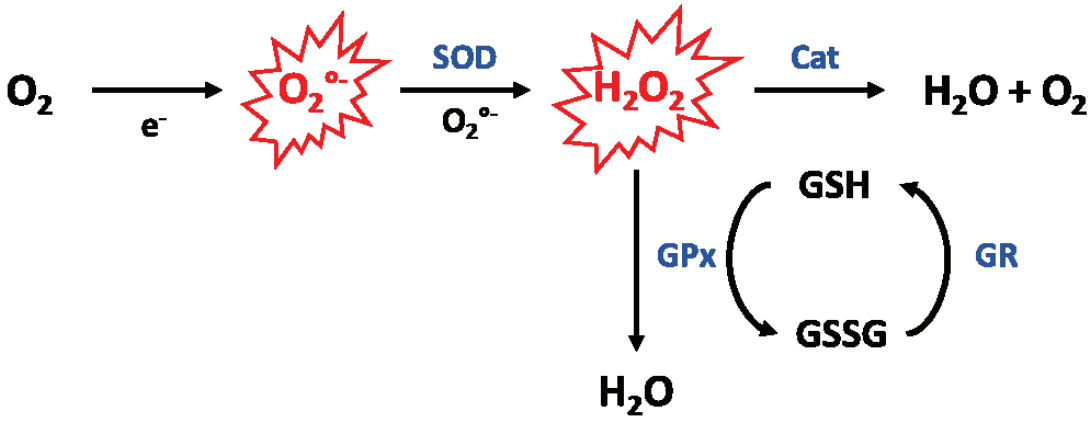


Figure 22. ***Interactions des enzymes antioxydantes***
SOD, superoxyde dismutase ; Cat, catalase ; GPx, glutathion peroxydase ; GR, glutathion réductase

c. Antioxydants enzymatiques dans l'athérosclérose

A l'inverse des ROS, les enzymes antioxydantes sont facilement dosables, par l'intermédiaire de cinétique de formation ou de consommation des produits issus des réactions que catalyse chacune des enzymes. Dans le contexte de l'athérosclérose, le stress oxydant est un paramètre majeur du développement de la pathologie, dû à la fois à une concentration élevée de ROS mais également à une diminution des défenses antioxydantes.

Concernant la superoxyde dismutase, plusieurs études ont montré son lien avec l'athérosclérose. En effet, durant les années 1990, il a été démontré l'implication de SOD dans la pathogénèse de l'athérosclérose, notamment en régulant l'oxydation des LDL par l'anion

superoxyde $O_2^{\circ-}$ (Fang et al. 1998). Cette étude a également mis en avant une meilleure efficacité des CuZn-SOD dans cette situation que des Mn-SOD. Dans un second temps, il a été montré que l'activité des SOD, en particulier SOD3, dans les plaquettes (Buczyński et al. 1993) ainsi que dans les CML endothéliales (Adachi et al. 1998), était diminuée chez les patients souffrant d'athérosclérose coronarienne.

Concernant le glutathion peroxydase, son implication dans l'athérosclérose a été également étudiée chez l'homme et l'animal. En effet, une étude animale a montrée l'implication directe de GPx dans la progression de la lésion athéroscléreuse par l'intermédiaire d'un modèle de souris déficientes en gènes ApoE et GPx (Torzewski et al. 2007). Et, il a aussi été montré à plusieurs reprises que l'expression de GPx était diminuée chez des patients souffrant d'athérosclérose coronarienne (Buczyński et al. 1993; Yegin et al. 1997; Tosukhowong et al. 2003). De plus, Takeshita et ses collaborateurs ont montré que le shear stress augmentait l'expression de GPx dans les cellules endothéliales. Un shear stress élevé étant plutôt athéroprotecteur, ceci confirme bien le rôle potentiel de GPx dans la prévention de l'athérosclérose.

Enfin, concernant la catalase, il existe moins d'études dans la littérature traitant de son rôle dans l'athérosclérose. On peut tout de même trouver quelques études de cultures cellulaires qui concernent catalase. En effet, le rôle de catalase dans la protection des cellules endothéliales de la cytotoxicité de H_2O_2 a été montré à plusieurs reprises (Santanam et al. 1999 ; Meilhac et al. 2000). Ainsi, les effets toxiques de H_2O_2 étant reconnus dans l'athérosclérose, on peut extrapoler un rôle athéroprotecteur de catalase (Meilhac et al. 2000). De plus, il a été montré plus récemment que des souris du modèle d'athérosclérose $ApoE^{-/-}$ surexprimant catalase (ou l'association catalase + CuZn-SOD) présentaient des lésions plus petites ou moins avancées que les souris $ApoE^{-/-}$ contrôles. Ils ont également montré qu'un retard du développement des lésions était corrélé à des concentrations plus faibles de F_2-isoprostanes plasmatiques et aortiques chez ces souris surexprimant catalase (ou l'association catalase + CuZn-SOD). Il

semble donc intéressant d'analyser l'expression de catalase, au même titre que SOD et GPx, chez des patients souffrant d'athérosclérose.

4. Rôle global du stress oxydant dans l'athérogénèse

Le stress oxydant joue un rôle majeur dans les processus d'initiation et de progression de l'athérosclérose. La première étape de l'athérogénèse, l'accumulation de cholestérol (internalisés ensuite par des macrophages) dans l'intima, est favorisée par la dysfonction endothéliale qui induit l'infiltration des LDL et la diapédèse des monocytes dans la paroi vasculaire. La perméabilité endothéliale, caractéristique de la dysfonction endothéliale, est augmentée en situation d'environnement pro-oxydant et de génération de ROS (McQuaid and Keenan 1997). Une fois dans l'intima, les LDL-C ne sont internalisés dans les macrophages que lorsqu'ils sont modifiés par oxydation et sont donc transformés en LDLox (Bonomini et al. 2008). Et, la présence de LDLox dans la paroi vasculaire induirait des mécanismes pro-athérogènes, comme l'inhibition de la motilité des macrophages ou la migration chimiotactique des monocytes (Inoue and Node 2006). La présence de LDLox va également promouvoir l'expression de molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) à la surface de la paroi vasculaire, qui amplifie les phénomènes de diapédèse leucocytaire. On parle alors d'activation endothéliale. Cette activation endothéliale conduit à la production et libération de cytokines pro-inflammatoires, de récepteurs de surface ou enzymes protéinases, comme par exemple des interleukines, interférons ou MCP-1 (Bonomini et al. 2008). Ainsi, le phénomène de dysfonction endothéliale s'auto-entretient, et l'endothélium devient plus perméable aux lipides et cellules immunitaires, favorisant de fait la formation de cellules spumeuses. Les cellules spumeuses vont également participer à l'entretien de l'inflammation chronique en augmentant la production de cytokines pro-inflammatoires (Bonomini et al. 2008). On peut ainsi parler de cercle vicieux facilitant l'initiation de l'athérogénèse (Figure 22).

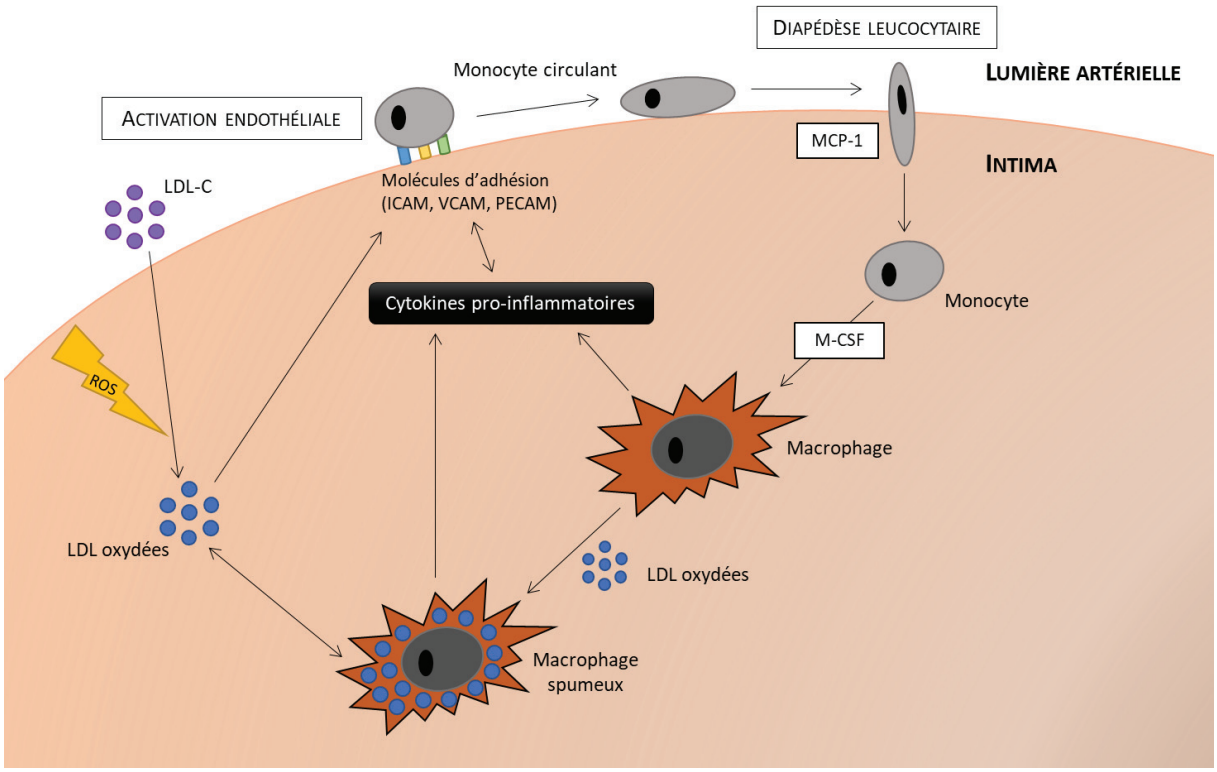


Figure 23. ***Rôle du stress oxydant et de l'inflammation dans l'initiation de l'athérogénèse***

LDL-C, lipoprotéines de basse densité-cholestérol ; LDL oxydés, lipoprotéines de basse densité oxydées ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; ICAM, molécule d'adhérence intercellulaire ; VCAM, molécule d'adhérence cellulaire vasculaire ; M-CSF, monocyte-colony stimulating factor ; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1

Outre le fait d'être une barrière physique, l'autre rôle majeur de l'endothélium est de réguler la vasomotricité par la synthèse de NO. L'augmentation de la concentration des ROS, et ainsi du stress oxydant, entraine la réduction de la biodisponibilité du NO. Cette diminution a pour conséquence une vasoconstriction accentuée ainsi que l'agrégation plaquettaire et le phénomène d'adhérence des neutrophiles à l'endothélium amplifiés (Vogiatzi et al. 2009a). Les ROS, et l'anion superoxyde $O_2^{\circ -}$ en particulier, peuvent interagir avec NO pour former l'ion peroxynitrite $ONOO^-$, qui est également un radical libre, et participe à la diminution de la biodisponibilité du NO. Comme nous l'avons vu précédemment, le stress oxydant et l'inflammation agissent en synergie lors de l'initiation et le développement de l'athérogénèse. Il est donc intéressant de noter que l'activation des monocytes, des macrophages et des cellules endothéliales induit l'expression de iNOS (NO synthase inductible). La fonction de cette enzyme est de catalyser la transformation de la L-arginine en NO. Ainsi, l'activation des cellules

inflammatoires et cellules endothéliales favorise indirectement la formation de peroxynitrite, et donc entretient l'environnement pro-oxydant dans la paroi vasculaire (Victor et al. 2009). NO a également la capacité de stimuler la formation de H_2O_2 et $O_2^{\circ -}$ par la mitochondrie, en favorisant la fuite d'électrons de la chaîne de transport mitochondriale. Et, H_2O_2 est impliqué dans la régulation de iNOS par l'intermédiaire de NF-κB (Victor et al. 2009).

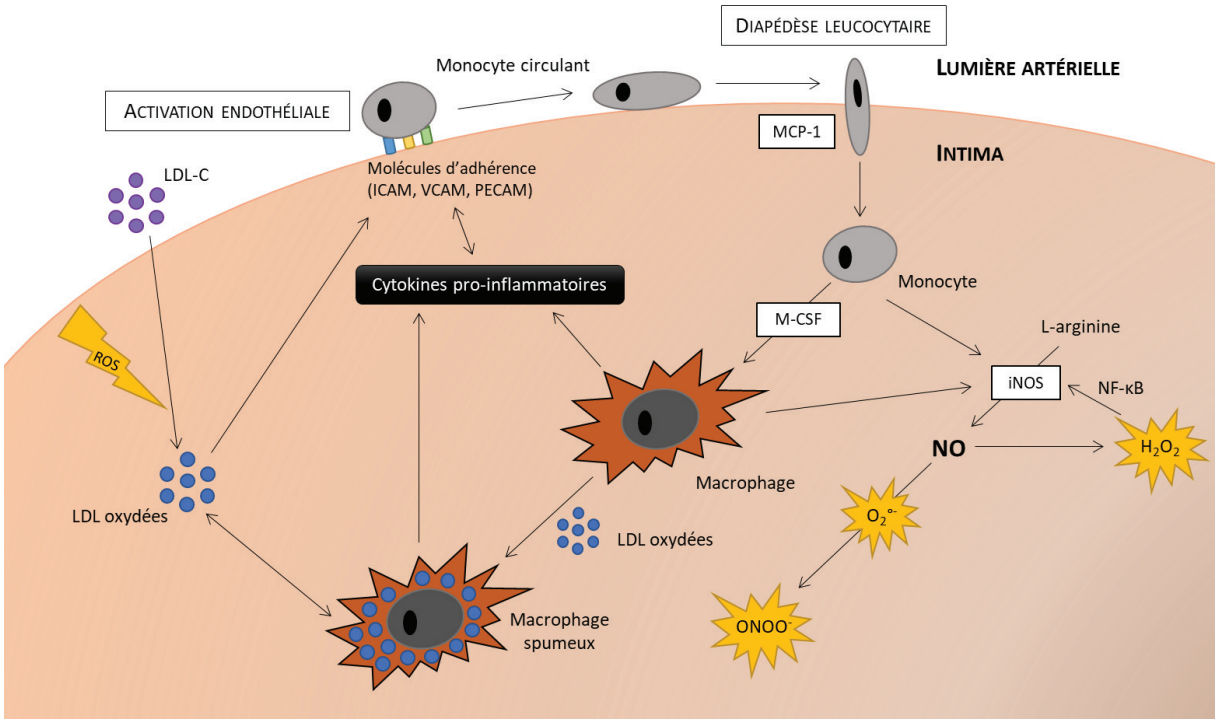


Figure 24. ***Rôle du stress oxydant, de l'inflammation et du métabolisme du NO dans l'initiation de l'athérogénèse***

LDL-C, lipoprotéines de basse densité-cholestérol ; LDL oxydés, lipoprotéines de basse densité oxydées ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; ICAM, molécule d'adhérence intercellulaire ; VCAM, molécule d'adhérence cellulaire vasculaire ; M-CSF, monocyte-colony stimulating factor ; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1 ; NO, monoxyde d'azote ; H_2O_2, peroxyde d'hydrogène ; $O_2^{\circ -}$, anion superoxyde ; $ONOO^-$, peroxynitrite ; iNOS, NO synthase inductible

B. IMMUNITÉ INNÉE

Comme nous venons de le voir dans le paragraphe précédent, les monocytes et macrophages sont très impliqués dans la phase d'initiation de l'athérogénèse et agissent en synergie avec le stress oxydant. Ces cellules immunitaires sont des composants de l'immunité innée, nous allons donc voir dans cette partie comment l'immunité innée intervient dans le processus d'athérogénèse.

1. Définition : rôle et acteurs

L'immunité innée constitue la première ligne de défense vis-à-vis des molécules infectieuses et pathogènes qui nous entourent. Elle correspond aux moyens de défense immédiats mis en œuvre pour lutter contre ces agents infectieux. Afin de faire barrière à la pénétration de l'intrus, plusieurs systèmes de défense mis en œuvre.

Le premier système de défense de l'immunité innée est une barrière physique constituée de la peau et des muqueuses. Cette barrière est en contact direct avec les virus, parasites ou autres bactéries, et empêche leur pénétration par l'intermédiaire de mécanismes chimiques (protéines antimicrobiennes capables de déstructuration enzymatique), biologiques (flore bactérienne participant au barrage) ou mécaniques (faible perméabilité de la peau).

Une fois que l'agent infectieux se trouve dans l'organisme, le second système de défense de l'immunité innée intervient. Une réaction inflammatoire est mise en place faisant intervenir plusieurs acteurs, des cellules phagocytaires et des cytokines. La phagocytose est un processus qui consiste en l'élimination de molécules étrangères par internalisation cellulaire, réalisée par les macrophages principalement, mais également par les cellules dendritiques et les polynucléaires (neutrophiles, basophiles et éosinophiles). Elle est constituée de plusieurs étapes :

- La *reconnaissance de l'antigène* (directe ou via des molécules intermédiaires, les opsonines) selon la résistance du pathogène.

- Le ***chimiotactisme*** qui permet d'attirer les phagocytes vers le pathogène à l'aide de chimiokines.
- La ***phase d'adhérence*** qui permet au phagocyte de se lier au pathogène grâce à la reconnaissance spécifique des molécules présentes à la surface de la bactérie par des récepteurs du phagocyte.
- La ***phase rhéologique*** qui permet de former la vacuole dans laquelle va être contenue la bactérie avant son élimination.
- La ***phase d'élimination*** qui permet la digestion du pathogène et induit la production de ROS et de peroxynitrite.

Cette phagocytose est alors accompagnée d'une production de cytokines pro- et anti-inflammatoires ainsi que des molécules vasodilatatrices. La libération de cytokines permet le recrutement de différentes cellules au niveau de l'inflammation. La production de NO va permettre une augmentation de la perméabilité vasculaire qui, à l'aide d'une plus forte expression des molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales induite par le TNF-α, facilitera le processus de diapédèse leucocytaire (Figure 7). Le TNF-α entraine également la mise en place d'un phénomène de coagulation afin d'inhiber la propagation sanguine des agents infectieux. Le TNF-α participe à l'activation de la phase de réponse aigue de l'inflammation en induisant la production de CRP (protéine c-réactive), dont la concentration augmente 10000 fois lors d'une infection ou dommage tissulaire (Gabay and Kushner 1999). Pour cette étape, le TNF-α est aidé par les interleukines IL-6 et IL-1. Enfin, la production de cytokines, en particulier de chimiokines, permet le recrutement de cellules phagocytaires afin d'éliminer les agents infectieux par phagocytose.

Ainsi, l'immunité innée est composée de plusieurs acteurs dont les principaux sont les phagocytes et les cellules « Natural Killer » (NK). L'ensemble de ces cellules sont d'origine hématopoïétique, et issues d'une même cellule souche multipotente.

Parmi les phagocytes, nous pouvons compter les macrophages (et leurs précurseurs monocytes), les cellules dendritiques et les polynucléaires. Les macrophages sont les principales cellules phagocytaires. Leurs fonctions principales sont de nettoyer l'organisme des agents pathogènes, corps apoptotiques ou nécrotiques, mais ils peuvent jouer également le rôle de cellule présentatrice d'antigène (aux lymphocytes T dans le cadre de l'immunité adaptative). Suivant leurs localisations dans l'organisme, les macrophages résidents peuvent porter le nom de cellules de Kupffer (foie) ou cellules microgliales (tissu nerveux). Les monocytes sont, quant à eux, les précurseurs des macrophages (ou des cellules dendritiques). Ils se différencient dans le tissu où ils résident. Ensuite, les cellules dendritiques sont des cellules possédant des expansions cytoplasmiques appelées dendrites. Les cellules dendritiques ont également la capacité de phagocytose mais leur rôle principal est d'activer la réponse immunitaire adaptative. En effet, elles sont des cellules présentatrices d'antigène, et activent ainsi les lymphocytes B et T. Enfin, parmi les polynucléaires, seuls les neutrophiles jouent un rôle de phagocyte, les basophiles et les éosinophiles étant impliqués dans les processus d'allergie.

La dernière classe de cellules de l'immunité innée sont les « Natural Killer ». Ces cellules font partie de la famille des lymphocytes mais ne sont ni des lymphocytes B, ni des lymphocytes T. Comme l'indique son nom, le NK peut tuer spontanément tout type de cellules, à condition qu'elle ne présente pas de molécules de classe 1 du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité), signe d'une cellule saine.

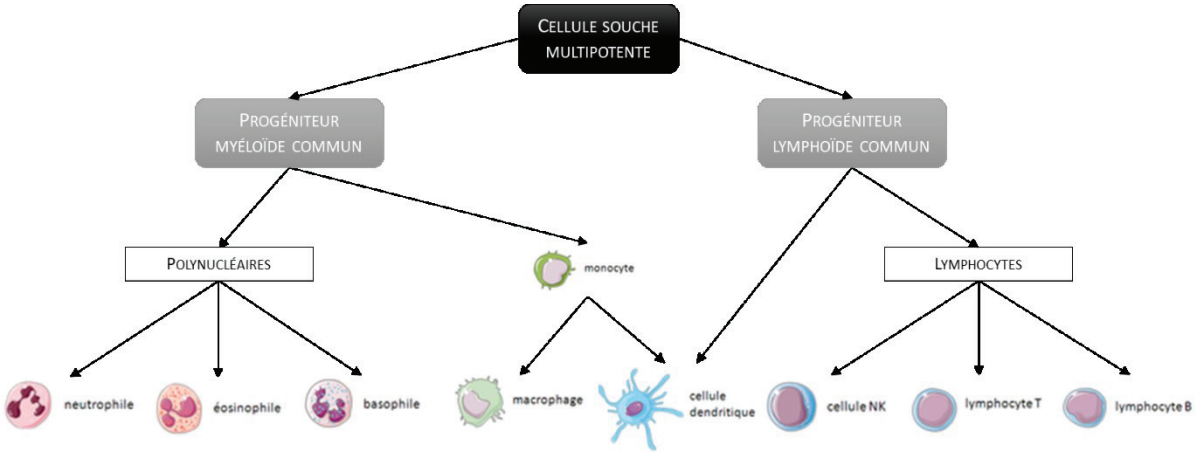


Figure 25. ***Principales cellules du système d'immunité innée***

2. Sous-populations de monocytes et macrophages

Bien que les macrophages et indirectement les monocytes soient les cellules immunitaires les plus impliquées dans l'initiation et le développement de l'athérogénèse, il est important de noter que pour chacun des deux types cellulaires, il existe plusieurs sous-populations, ayant des fonctions plutôt pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires.

a. Sous-population de monocytes

Trois principales sous-populations de monocytes ont été identifiées chez l'homme, respectivement caractérisés comme « classiques », « intermédiaires » et « non classiques » (Passlick et al. 1989 ; Wong et al. 2011). Pour les différencier, deux clusters de différenciation (CD) sont utilisés chez l'homme : CD14 et CD16. L'ensemble des sous-populations de monocytes expriment à leur surface CD14 en plus ou moins grande quantité (alors appelés $CD14^{+}$ ou $CD14^{++}$ selon la sous-population). La différence entre les sous-populations de monocytes réside dans l'expression, en plus ou moins grande quantité ($CD16^{+}$ ou $CD16^{++}$), ou non de CD16. En effet, les monocytes dits classiques (ou Mon1) expriment $CD14^{++}$ $CD16^{-}$, les monocytes dits intermédiaires (ou Mon2) expriment $CD14^{++}$ $CD16^{+}$ et les monocytes dits non classiques (ou Mon3) expriment $CD14^{+}$ $CD16^{++}$. Il a été montré que les monocytes classiques $CD14^{++}$ $CD16^{-}$ et intermédiaires $CD14^{++}$ $CD16^{+}$ produisent des cytokines pro-inflammatoires

(TNF-α, IL-1β, IL-6) en grande quantité alors qu'ils produisent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) en faible quantité, ce qui a permis de caractériser ces monocytes comme ayant un phénotype pro-inflammatoire (Ziegler-Heitbrock 2007 ; Anbazhagan et al. 2014 ; Patel et al. 2017). Néanmoins, durant la dernière décennie, il a été montré que les monocytes intermédiaires possédaient un fort potentiel pro-inflammatoire tandis que les monocytes classiques montraient un fort potentiel phagocytaire (Zawada et al. 2011 ; Idzkowska et al. 2015). A l'inverse, les monocytes non classiques $CD14^{+}$ $CD16^{++}$ produisent une faible quantité de TNF-α et une forte quantité de IL-10, ce qui a permis de les caractériser comme monocytes anti-inflammatoires (Geissmann et al. 2003 ; Anbazhagan et al. 2014). De plus, il a été montré que les monocytes non classiques étaient impliqués dans la surveillance tissulaire, notamment par l'intermédiaire de l'expression de molécules d'adhérence (Cros et al. 2010). L'impact des monocytes pro-inflammatoires dans l'athérosclérose a été étudié à plusieurs reprises. Il a tout d'abord était montré que les macrophages présents dans les lésions précoces d'athérosclérose exprimaient CD16 à leur surface (Häkkinen et al. 2000), ce qui laisse penser l'implication des monocytes CD16 dans l'initiation de l'athérosclérose. Et, la présence de ces monocytes est corrélée avec les lipides, ainsi qu'avec la diminution du taux de HDL-C chez des patients hypercholestérolémiques (Rothe et al. 1996). De plus, il a été montré lors d'une étude impliquant plus de 200 patients atteints d'athérosclérose coronarienne, une concentration de monocytes pro-inflammatoires $CD14^{+}$ $CD16^{+}$ plus élevée chez les patients que chez les sujets contrôles (Schlitt et al. 2004). Ils ont également montré une association entre les plus hauts niveaux de monocytes pro-inflammatoires et une prévalence plus élevée de la maladie. Enfin, il a été montré que la présence des monocytes $CD14^{+}$ $CD16^{+}$ était positivement corrélée avec la présence de facteurs d'instabilité (remodelage positif) (Kashiwagi et al. 2010). L'ensemble de ces résultats confirment l'implication de ces monocytes dans l'athérogénèse.

b. Sous-population des macrophages

De la même manière que les monocytes, il existe deux principales sous-populations de macrophages, les macrophages M1 pro-inflammatoires (activés par IFN-γ, TNF-α et LPS) et les macrophages M2 anti-inflammatoires (activés par IL-4 et IL-13). Néanmoins, les macrophages M2 ont ensuite été divisés en 3 sous-catégories, M2a, M2b et M2c, ayant chacune une fonction différente. Brièvement, lors d'une infection ou lésion tissulaire, les macrophages résidents sont activés, ce qui induit une production de cytokines, chimiokines et autres molécules inflammatoires, ainsi que le recrutement de monocytes circulants. La polarisation des macrophages est alors due aux cytokines environnantes produites par les lymphocytes T. Ainsi, les cytokines de nomenclature Th1 (IFN-γ, TNF-α) induisent une polarisation dite « classique » M1 alors que les cytokines de nomenclature Th2 (IL-4, IL-13) induisent une polarisation dite « alternative » M2. Cependant, il est important de préciser que les polarisations M1 ou M2 apparaissent comme les extrémités d'un continuum de formes d'activation, et qu'*in vivo*, l'activation des macrophages répond à un microenvironnement tissulaire et l'interaction avec les lymphocytes B et T (Mantovani et al. 2004). Les macrophages M1 sont dits pro-inflammatoires puisqu'ils produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α, IL-1, IL-6 ou encore IL-12. A l'inverse, les M2 sont dits anti-inflammatoires puisqu'ils produisent majoritairement la cytokine IL-10 qui est un facteur majeur d'inhibition de la production et de l'activité des cytokines pro-inflammatoires. Dans le contexte de l'athérosclérose, il existe un déséquilibre chronique entre les phénotypes de macrophages. De manière intéressante, il a été montré que les macrophages ont la capacité de changer de phénotype fonctionnel en réponse au microenvironnement, du fait de leur plasticité (Porcheray et al. 2005). Ainsi, l'environnement de la plaque induit le phénotype des macrophages, ce qui de fait influence la structure et l'évolution de la plaque d'athérosclérose (Tabas and Bornfeldt 2016).

3. Rôle global des monocytes/macrophages dans l'athérogénèse

De la même manière que le stress oxydant, l'immunité innée, par l'intermédiaire des monocytes et des macrophages, est au premier plan dans les processus d'initiation, de développement et de rupture de plaque (Moore et al. 2013). Comme nous l'avons évoqué précédemment, les macrophages représentent la sous-population de leucocytes la plus abondante, de façon générale et dans le contexte de l'athérosclérose. Les macrophages impliqués dans l'athérogénèse ont plusieurs origines : soit ils sont dits « résidents » et sont issus de la maturation des monocytes présents dans le tissu vasculaire (qu'ils ont investi directement après leur synthèse), soit ils sont issus de la maturation des monocytes circulants attirés au niveau de la lésion par la synthèse de chimiokines (Hansson and Libby 2006). Les monocytes circulants migrent vers le site de lésion principalement sous l'influence de la chimiokine MCP-1. Néanmoins, il existe d'autres chimiokines favorisant la migration leucocytaire telles que CXCL1 (ou GRO-α) (Zhang et al. 2013), CXCL10 (ou IP-10) (Liu et al. 2011), CCL22 (ou MDC) (Richter et al. 2014), ou encore GM-CSF (Vogel et al. 2015). La maturation des monocytes en macrophages, de manière générale et dans le contexte de l'athérosclérose, est induite par le facteur de croissance M-CSF (Libby 2012). M-CSF permet la prolifération des monocytes dans les lésions précoces d'athérosclérose et induit l'expression de récepteurs « scavengers », ce qui favorise le développement de la fonction phagocytaire (Clinton et al. 1992). Pendant les premières étapes de l'athérogénèse, les macrophages ont un rôle athéroprotecteur en limitant l'accumulation intravasculaire de LDLox par phagocytose (médiée notamment par le biomarqueur CD36). Néanmoins, à un stade plus avancé, l'action antiathérogène des macrophages n'est pas suffisante et les LDLox s'accumulent, ce qui provoque l'altération de la fonction phagocytaire des macrophages. Les cellules spumeuses formées subissent alors le phénomène d'apoptose, favorisé par un stress cellulaire et la réponse inflammatoire engendrée par l'activation des macrophages (Christ et al. 2016). L'apoptose de ces cellules spumeuses contribuent fortement à la formation du cœur nécrotique riche en lipides, caractéristique des

plaques avancées d'athérosclérose à risque de rupture (Christ et al. 2016). De plus, bien que les macrophages participent grandement à l'entretien de l'environnement pro-inflammatoire dans la plaque en secrétant de nombreuses cytokines, il est intéressant de noter que l'accumulation de cholestérol intracellulaire cause également de l'inflammation. En effet, la présence de cristaux de cholestérol engendre l'activation de molécules appelées inflammasomes sécrétant des cytokines telles que IL-1β ou IL-18 (Duewell et al. 2010). Enfin, au stade des lésions très avancées d'athérosclérose, les macrophages participent indirectement à la déstabilisation de la plaque par sécrétion des protéases MMP, qui contribuent à la rupture par dégradation de la chape fibreuse (Shah 2003).

C. MOLÉCULES INFLAMMATOIRES

Comme nous avons vu dans les deux parties précédentes, le stress oxydant et les cellules du système de l'immunité innée participent au développement de l'athérosclérose et à l'entretien de l'environnement directement et indirectement par la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, formant ainsi un cercle vicieux conduisant à la rupture de plaque. Nous allons voir dans cette partie, quelles molécules spécifiques sont impliquées dans le processus d'athérogénèse, et comment elles participent au phénomène.

1. Définition

L'inflammation, ou réaction inflammatoire, est la réaction de l'organisme suite à une attaque tissulaire endogène ou exogène dont l'objectif final est l'élimination de l'agent pathogène et la réparation du tissu lésé. Initialement, la réaction inflammatoire est un processus réparateur, mais il est possible que ce processus devienne néfaste pour l'organisme en cas d'anomalies lors de la régulation du processus ou d'une quantité trop élevée des cellules intervenant dans la réaction. On parle alors d'inflammation chronique, phénomène où les lésions s'aggravent dans le temps. L'inflammation fait intervenir différents acteurs : des cellules de l'immunité innée et adaptative (cf Chap 3.B.1), des molécules d'adhérence permettant l'infiltration des cellules immunitaires dans

les tissus lésés par diapédèse (Figure 7), et des médiateurs chimiques pro- et anti-inflammatoires. Comme nous l'avons déjà évoqué dans la partie précédente, les macrophages (et autres cellules phagocytaires) interviennent dans le processus d'élimination des pathogènes par phagocytose mais également par sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui perpétuent la réaction. Les cytokines sont des petites protéines synthétisées entre autres, par diverses cellules leucocytaires (lymphocytes et monocytes/macrophages activés). Elles agissent en tant que médiateurs de la communication intercellulaire. Elles ont la capacité d'agir à faible concentration, à proximité de leur lieu de synthèse, et soit sur une cellule voisine (action paracrine), soit sur la cellule qui les a synthétisées (action autocrine). Les cytokines sont nombreuses et regroupées par classe selon leur action. Parmi les principales, on distingue les chimiokines, les interleukines (IL), les facteurs de nécrose tumorale (TNF) et les interférons (IFN).

Les chimiokines sont des petites cytokines solubles chimiotactiques qui ont pour rôle principal le recrutement des cellules immunitaires au site de l'inflammation et le contrôle de leur activation. Elles sont principalement produites en réponse à une réaction inflammatoire. Elles sont classées en différentes sous-familles, en fonction de leur composition en acides aminés cystéine (C, CC, CXC ou CX3C). Parmi les plus connues, on compte CCL2 (ou MCP-1 évoqué dans Chap 1.B.1), CCL5 (ou RANTES) ou encore CXCL8 (ou IL-8).

Les interleukines sont une classe de cytokines ainsi nommées du fait de leur sécrétion et utilisation par les leucocytes comme moyen de communication. Il a finalement été montré qu'elles étaient produites par différents types de tissus et cellules (on en compte 37 différentes en 2016), et n'ont pas de lien biochimique entre elles. Elles peuvent avoir une action pro-inflammatoire et anti-inflammatoire. Parmi les principales interleukines, on distingue IL-1, IL-6 pour les pro-inflammatoires et IL-10 pour les anti-inflammatoires.

Les facteurs de nécrose tumorale (TNF) est un groupe de cytokines pro-inflammatoires la plus importante qui stimule la phase de réaction aigue et les processus de mort cellulaire. Ils agissent

aussi au niveau de l'endothélium vasculaire afin de stimuler la synthèse des molécules d'adhérence aidant à la diapédèse leucocytaire.

Enfin, les interférons sont des cytokines produites en réponse à une infection qu'elle soit virale, bactérienne ou parasitaire, ou encore suite à la présence de cellules tumorales. Leur fonction principale est l'inhibition de la réplication virale dans les cellules de l'hôte (organisme). Ils réalisent ceci grâce à l'activation des NK, des macrophages et des lymphocytes.

2. Molécules pro-inflammatoires impliquées dans l'athérosclérose

Dans le contexte de l'athérosclérose, et en particulier lors des premières phases de l'athérogénèse, certaines cytokines participent grandement au développement et à l'entretien du contexte inflammatoire intraplaque.

La principale cytokine impliquée dans l'athérogénèse est le TNF-α. Les TNF sont produits en majorité par les monocytes/macrophages activés et autres leucocytes, mais également par les cellules endothéliales. Sa production fait généralement suite à une infection, et est stimulée par d'autres cytokines pro-inflammatoires comme IL-1. Ses fonctions sont multiples, et sont généralement réalisés en synergie avec les interleukines IL-1 et IL-6. Comme nous l'avons dit précédemment, TNF-α est impliqué dans la phase de réaction aigue de l'inflammation, notamment dans le déclenchement de la fièvre (via les prostaglandines) et l'augmentation de CRP au niveau du foie. Il intervient également dans l'activation de NF-κB, l'attraction des neutrophiles au site de l'inflammation, l'expression des molécules d'adhérence facilitant la diapédèse leucocytaire, la stimulation du processus phagocytaire des macrophages ainsi que leur production d'IL-1. De plus, TNF-α est impliqué dans les processus de mort cellulaire, l'apoptose et la nécrose programmée.

L'interleukine 1 est une cytokine sécrétée par les monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Il existe en réalité plusieurs variantes de la cytokine dont les plus connues sont l'IL-1α et l'IL-1β. IL-1 présente beaucoup de similitudes avec TNF-α : elle est également produite

suite à une infection, intervient aussi dans la phase de réaction aigue de l'inflammation (déclenchement de la fièvre via les prostaglandines et production hépatique de CRP), stimule l'expression des molécules d'adhérence de l'endothélium ainsi que la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par l'endothélium (IL-1, IL-8, IL-6). Leurs fonctions communes permettent à ces deux cytokines d'agir en synergie pendant la réaction inflammatoire.

L'interleukine 6 joue également un rôle important dans les processus inflammatoires. C'est une cytokine produite par les macrophages, les lymphocytes T et les fibroblastes en réponse à une infection, lésion ou par stimulation d'IL-1. Tout comme IL-1 et TNF-α, IL-6 est impliqué dans la phase de réaction aigue de l'inflammation, comme médiateur de la fièvre et producteur de CRP hépatique. IL-6 se différencie du TNF-α et IL-1 par son rôle sur les lymphocytes B dans leur différenciation et leur prolifération et sur l'induction d'anticorps. Enfin, IL-6 joue un rôle dans l'hématopoïèse en stimulant la production de progéniteurs ainsi que dans la coagulation en activant la formation de plaquettes.

L'interféron gamma fait partie d'une autre sous-famille de cytokines produite dans le but d'interférer avec la réplication virale, et d'activer les cellules du système d'immunité innée macrophages, NK et lymphocytes. L'interféron gamma, qui appartient à la classe des interférons de type 2, sont produits par les lymphocytes B et T ainsi que les NKT (natural killer T cells) lors de la réponse immunitaire adaptative. Comme les cytokines précédentes, l'interféron gamma a plusieurs fonctions : protection contre les infections virales, stimulation de l'activité phagocytaire des macrophages, maturation des L_B et L_T, expression des molécules du CMH et activation des neutrophiles et des NK.

La chimiokine MCP-1 joue un rôle également très important dans le processus immunitaire. Elle est également connue sous le nom de CCL2 reflétant ainsi son rôle chimiotactique sur les monocytes, mais aussi sur les lymphocytes et les basophiles. Elle est sécrétée par les macrophages, les cellules endothéliales, les myocytes et les fibroblastes. Sa fonction est d'attirer

les cellules immunitaires vers les sites de lésions, en particulier les monocytes, lorsque CCL2 est sécrétée par les cellules endothéliales. De fait, les monocytes transmigrent dans la paroi vasculaire et se différencient en macrophages qui eux-mêmes sécrèteront la cytokine afin d'amplifier le recrutement de cellules immunitaires.

Comme précédemment évoqué, la chimiokine CXCL1 (ou GRO-α) est également importante dans l'initiation de l'athérogénèse. En effet, CXCL1 favorise l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Vries et al. 2015; Hartmann et al. 2015), plus particulièrement les monocytes classiques. De plus, il a été montré que CXCL1 était plus exprimé à la surface des cellules endothéliales lors des étapes initiales de l'athérosclérose, et pouvait promouvoir l'accumulation de macrophages dans des lésions établies (Hartmann et al. 2015).

Enfin, la cytokine CXCL10 (ou IP-10) joue un rôle chimiotactique pour les monocytes. Il a également été montré que CXCL10 agissait dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales (van den Borne et al. 2014). Ainsi, plusieurs études ont trouvé une expression de CXCL10 augmentée à la fois au niveau de la plaque et dans le plasma de patients présentant une resténose coronarienne (Mach et al. 1999; Kawamura et al. 2003).

Cette liste de cytokines pro-inflammatoires n'est pas exhaustive, mais représente celles qui semblent être les plus impliquées dans le processus d'athérogénèse.

3. Molécules anti-inflammatoires impliquées dans l'athérosclérose

La réaction inflammatoire est initialement un processus bénéfique pour l'organisme, car comme pour le stress oxydant, il existe des molécules ayant la capacité de contrebalancer l'effet néfaste des cytokines pro-inflammatoires et réguler le processus. Ces molécules anti-inflammatoires sont également impliquées dans la processus d'athérogénèse.

La principale cytokine anti-inflammatoire est l'interleukine 10 (IL-10). Cette cytokine est produite en majorité par les monocytes et macrophages, mais aussi par les L_B et les cellules de type Th2. Son rôle est de stimuler la différenciation des L_B en plasmocytes, mais surtout d'inhiber la

prolifération des lymphocytes de type Th1 (par inhibition de la fonction CPA) et la production d'IL-12 (cytokine pro-inflammatoire) par les macrophages. De plus, IL-10 est capable de réguler la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages mais surtout d'inhiber l'expression des métalloprotéases MMP-1 et MMP-9, ainsi que de stimuler l'expression de l'inhibiteur endogène des MMP, le TIMP-1. L'ensemble de ces fonctions font de l'IL-10 la cytokine Th2 avec les effets anti-inflammatoires les plus puissants.

Le facteur de croissance transformant beta (TGF-β) a également été montré pour avoir des effets anti-inflammatoires. TGF-β est également une cytokine qui peut être produite par de nombreuses cellules (immunitaires ou non). Néanmoins, TGF-β est sécrété sous forme inactive au sein d'un complexe qui a besoin d'être activé pour être fonctionnel. Plusieurs formes de TGF-β existent chez les mammifères, et il semblerait que ce soit la forme TGF-β1 qui soit impliquée dans l'athérosclérose. Cette forme est en effet impliquée dans l'hématopoïèse et la différenciation endothéliale. Aussi, TGF-β1 possède de nombreuses fonctions anti-inflammatoires, comme l'inhibition de l'expression des molécules d'adhérence endothéliales E-sélectine et VCAM-1, l'inhibition de la production d'IL-8 par les cellules endothéliales induite par le TNF-α ainsi que la migration des neutrophiles à travers l'endothélium due à l'IL-8. Enfin, l'expression de TGF-β est capable de contrer l'inhibition de la vasodilatation endothéliale induite par le TNF-α. Enfin, comme TGF-β semble être la molécule capable de neutraliser les effets néfastes du TNF-α, il a été montré qu'il module négativement l'expression des récepteurs du TNF-α.

4. Rôle global des molécules pro- et anti-inflammatoires dans l'athérogénèse

Comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, le stress oxydant et l'inflammation agissent en synergie dans les processus d'initiation et de développement de l'athérogénèse, avec une participation importante des cellules de l'immunité innée, principalement les monocytes et macrophages. Ainsi, l'inflammation prend part aux processus d'athérogénèse à différents niveaux : dès les premiers stades en activant l'endothélium et en recrutant les cellules phagocytaires sur le site de lésion et par la production locale et systémique de cytokines pro-

inflammatoires, entretenant l'environnement pro-inflammatoire intraplaque ; dans les stades plus avancés par la production de protéases et la dégradation des protéines de la chape fibreuse ainsi que l'apoptose des différentes cellules de la plaque favorisant la formation du noyau nécrotique et alors la déstabilisation de la plaque d'athérosclérose.

La réponse immunitaire dans la plaque d'athérosclérose est médiée par de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, et est perpétuée par les monocytes/macrophages et autres lymphocytes (Tabas and Bornfeldt 2016). Les principaux médiateurs de l'inflammation dans la plaque sont TNF-α, IL-1, IL-6 et IFN-γ, ainsi que d'autres cytokines comme IL-8, IL-12, IL-15 ou encore IL-18 (Gisterå and Hansson 2017). Chacune de ces cytokines a la capacité de sécréter ou favoriser la sécrétion d'autres cytokines. Ainsi, l'environnement pro-inflammatoire perpétré par l'expression de ces cytokines influence la libération de chimiokines comme MCP-1 et IL-8, à l'origine de la migration des cellules phagocytaires que sont les monocytes et les neutrophiles. Elles influencent également l'expression des molécules d'adhérence endothéliales comme VCAM-1, ICAM-1 ou P-sélectine, qui facilitent la transmigration des leucocytes par diapédèse (Figure 7) au niveau du site de lésion (Gisterå and Hansson 2017). De plus, il a été montré que les cytokines avaient également un effet sur les CML. En effet, elles induisent l'expression de plusieurs métalloprotéases (MMP-2, MMP-3, MMP-9 et MMP-13) (Galis et al. 1994) alors que la présence d'IL-1 et TNF-α n'influencent pas l'expression des TIMP (inhibiteurs tissulaires des MMP), et IFN-γ a été montré pour inhiber la production plusieurs types de collagène (Amento et al. 1991). Ainsi, dans le contexte d'une inflammation excessive dans la plaque avec l'expression importante d'IL-1, TNF-α et IFN-γ, nous pouvons observer une augmentation de l'expression des MMP (par IL-1 et TNF-α) accompagnée d'une diminution de synthèse de matrice extracellulaire médiée par IFN-γ, et une constance des niveaux de TIMP. Ceci conduit donc à un déséquilibre de la balance pro/anti-inflammatoire, et entraine ainsi une plus forte dégradation de la matrice extracellulaire et une fragilisation accentuée de la chape fibreuse (Libby 2001).

A l'inverse, peu d'effets anti-inflammatoires d'IL-10 ont été rapportés au niveau des cellules vasculaires. Ceci s'explique en raison de l'absence de récepteurs IL-10 sur les cellules du système vasculaire. Néanmoins, la présence d'IL-10 dans les plaques d'athérosclérose humaines a été prouvé (Mallat et al. 1999) de même que son rôle protecteur. En effet, l'expression d'IL-10 est négativement corrélée avec des signes d'inflammation comme l'expression de NOS II et avec la mort cellulaire par apoptose (Mallat et al. 1999). Ce rôle protecteur peut être expliqué par l'inhibition des interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales induite par IL-10 et par l'inhibition de la production des cytokines et chimiokines des macrophages et lymphocytes (Henke et al. 2000). Concernant TGF-β, peu d'études *in vivo* ont analysé ses effets anti-inflammatoires dans les plaques humaines. Cependant, il existe plusieurs études à ce propos chez la souris. Tout d'abord, il a été montré chez des souris TGF-β1$^{+/-}$ sous régime hypercholestérolémique que l'expression des molécules d'adhérence VCAM-1 et ICAM-1 et que l'accumulation de macrophages au niveau du sinus aortique étaient plus importantes que chez des souris contrôles sous le même régime (Grainger et al. 2000). De la même manière, il a ensuite été montré chez des souris ApoE$^{-/-}$ que l'inhibition de la voie de signalisation TGF-β (par un anticorps bloquant) accélère le développement des plaques et en modifie la composition (Mallat et al. 2001). En effet, suite au blocage de TGF-β, les souris ApoE$^{-/-}$ présentent des plaques au phénotype instable, caractérisé par une diminution du taux de collagène et une augmentation de l'accumulation de macrophages et de lymphocytes. Ces deux études suggèrent donc l'effet protecteur de TGF-β1 contre l'inflammation vasculaire.

D. LIENS ENTRE LE STRESS OXYDANT, L'IMMUNITÉ INNÉE, L'INFLAMMATION ET L'INSTABILITÉ DE LA PLAQUE

Le stress oxydant, l'immunité innée et les molécules inflammatoires sont également largement impliqués dans l'athérosclérose à des stades plus avancés de la pathologie, et participent activement à la déstabilisation de la plaque. Plusieurs études, lors des dernières décennies, ont

rapporté que l'hémorragie intraplaque, la néovascularisation et l'accumulation de macrophages, trois des principaux facteurs d'instabilité de la plaque, étaient induits par l'hypoxie, et par un environnement pro-inflammatoire et pro-oxydant (Fayad and Fuster 2001; Dunmore et al. 2007 ; Sluimer et al. 2008 ; Pelisek et al. 2012 ; Chistiakov et al. 2015). Il est intéressant de noter que l'hémorragie intraplaque peut provoquer la production de ROS par l'intermédiaire de la libération d'hémoglobine et de fer générant ainsi un cercle vicieux entre hémorragie intraplaque, néovascularisation et stress oxydant.

L'inflammation est également un paramètre majeur de l'athérogénèse, en particulier via les macrophages. En effet, une accumulation de macrophages est observée dans l'intima (la couche la plus interne de l'artère) induisant la production de ROS, notamment via NADPH oxydase. D'un point de vue mécanistique, le stress oxydant pourrait être impliqué dans la polarisation pro-inflammatoire M1 des macrophages (Dasu et al. 2007). Ce mécanisme pourrait augmenter la réponse inflammatoire dans la plaque d'athérosclérose et ainsi amplifier le cercle vicieux « hémorragie intraplaque-néovascularisation-stress oxydant ». Il est intéressant de noter que les connaissances actuelles concernant le rôle de l'inflammation dans l'athérosclérose sont limitées à l'analyse de cellules inflammatoires circulantes, et principalement centrées sur les monocytes/macrophages. D'autres types de cellules immunitaires que les monocytes/macrophages pourraient être impliqués dans la physiopathologie (Libby et al. 2002a).

La néoangiogénèse a été intensément étudiée du fait de son potentiel rôle majeur dans la rupture de plaque. D'un point de vue mécanistique, la protéine HIF-1α, qui est régulée à la hausse par le stress oxydant et l'inflammation, active le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Forsythe et al. 1996) qui participe au développement subséquent de néovaisseaux (Ferrara 2009). Ces auteurs ont également observé que VEGF était plus fréquemment présent dans les plaques de patients symptomatiques, c'est à dire ayant subi un évènement ischémique type AVC ou AIT. De manière intéressante, HIF-1α a été montré comme étant un régulateur global de la réponse immunitaire, à la fois inflammatoire (via les macrophages et les neutrophiles)

et innée (Nizet and Johnson 2009). Par conséquent, l'expression de la protéine HIF-1α est régulée par des voies de signalisation impliquant le principal régulateur de la réponse immunitaire, NF-κB (nuclear factor-kappaB), soulignant une interdépendance de la réponse immunitaire innée et de la réponse hypoxique aux dommages infectieux et tissulaires (Rius et al. 2008). D'un autre côté, il a précédemment été démontré qu'une expression augmentée de la protéine HIF-1α dans les leucocytes dans un contexte d'hypoxie et d'hypoxie intermittente était modulée par le stress oxydant (Pialoux et al. 2009a, b).

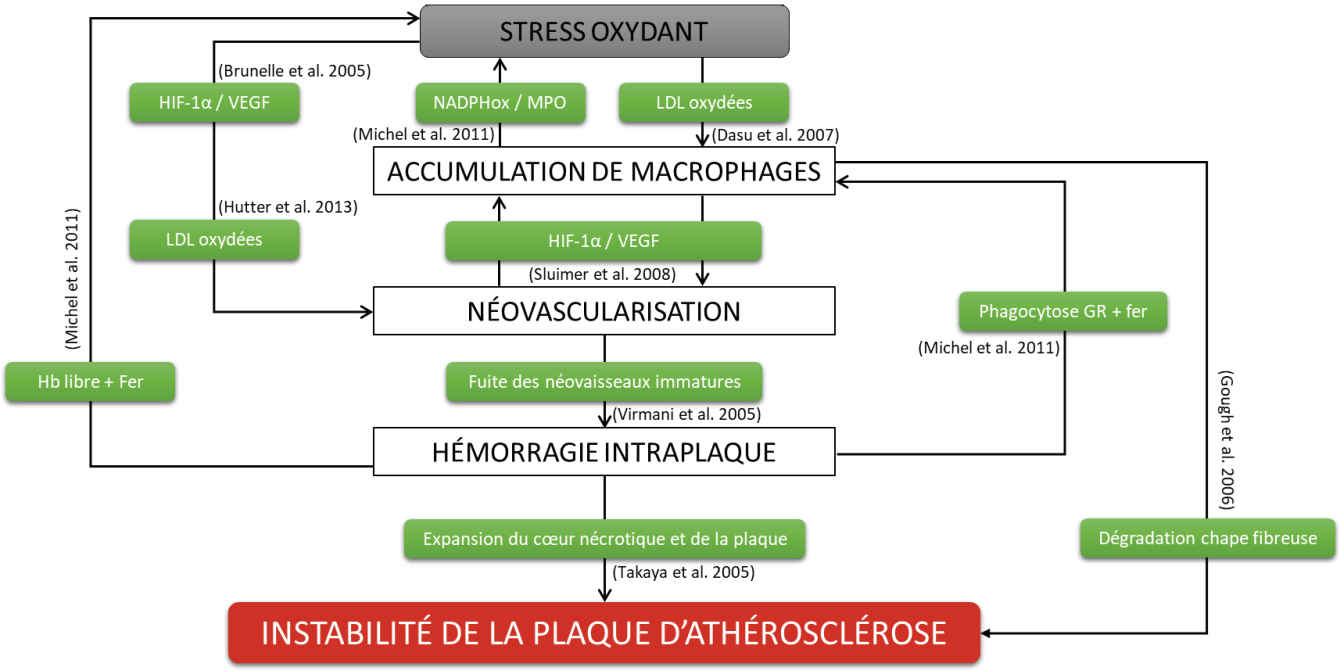


Figure 26. ***Cercle vicieux de l'instabilité de la plaque d'athérosclérose***

CHAPITRE 4 : IMPLICATION DE L'HEMORHEOLOGIE DANS LE CONTEXTE DE L'ATHEROSCLEROSE

1. Définition générale de l'hémorhéologie et de ses principaux paramètres

L'hémorhéologie, ou rhéologie du sang, correspond à l'étude de l'écoulement du sang en rapport avec les contraintes hémodynamiques que sont les pressions, débits et résistances. Pour étudier l'hémorhéologie, la loi de Poiseuille sur l'écoulement de fluides comme l'eau ou l'éthanol dans des tubes en verre, est très utilisée, notamment en médecine cardiovasculaire :

$$Q = \frac{\Delta P \times \pi \times r^4}{8 \times \mathrm{L} \times \eta}$$

Où Q : débit du liquide ; ΔP : différence de pression entre l'entrée et la sortie du tube ; r : rayon du tube ; L : longueur du tube et η : viscosité du fluide.

Néanmoins, il est important de noter que le sang n'est pas un fluide newtonien (comme l'eau ou l'éthanol), et que les propriétés vasomotrices des vaisseaux sanguins ne sont pas prises en compte dans la valeur fixe du rayon d'un tube en verre. Ainsi, bien que très utilisée et très pratique, la loi de Poiseuille comporte des limites car elle ne tient pas compte des propriétés non-newtoniennes du sang et de la complexité des interactions entre les propriétés rhéologiques du sang et la vasomotricité (S P Sutera and Skalak 1993).

Afin de mieux comprendre comment se comporte le sang dans nos vaisseaux en situation physiologique et/ou pathologique, il est nécessaire de savoir comment est composé le sang. Le sang est un liquide composé à environ 55% de plasma (partie liquide majoritairement composée d'eau) et 45% d'éléments figurés (globules rouges, globules blancs, plaquettes…), en situation physiologique. Parmi les éléments figurés du sang, les globules rouges (ou érythrocytes) représentent un pourcentage très élevé (environ 600 globules rouges pour 1 globule blanc et 30 plaquettes). Ainsi les globules blancs et les plaquettes sont plus rarement pris en compte dans

l'analyse des fluides (principalement dans les vaisseaux dont le diamètre est équivalent à celui des globules blancs). Le volume occupé par les globules rouges (GR) dans le sang est représenté par la valeur de l'hématocrite (Hct) qui peut varier dramatiquement en situation pathologique.

Le plasma, qui est composé à 90% d'eau et environ 10% de protéines diverses, se comporte comme un fluide newtonien. Il est majoritairement composé de 4 types de protéines : les albumines, les globulines, les lipoprotéines et le fibrinogène. Les albumines et les globulines représentent la majorité des protéines plasmatiques et agissent dans les échanges entre le sang et les tissus. Le fibrinogène joue un rôle très important dans le processus de coagulation sanguine (il est le précurseur de la fibrine qui constitue le squelette du caillot), mais il est également impliqué dans la formation des rouleaux de globules rouges.

a. Viscosité sanguine

De par son importance dans la loi de Poiseuille, le paramètre hémorhéologique auquel on pense le plus est la viscosité sanguine. La viscosité sanguine représente la résistance naturelle du sang à son écoulement dans les vaisseaux sanguins. Elle est dépendante du taux de globules rouges dans le sang, elle est ainsi proportionnelle à l'hématocrite. On peut différencier la viscosité sanguine de la viscosité plasmatique, qui elle est fonction de la concentration des différentes protéines le composant, dont le fibrinogène est le principal acteur. La viscosité sanguine peut être calculée en faisant le rapport de la contrainte (force de frottement qui s'exerce sur les différentes couches de fluides parallèles) sur la vitesse de cisaillement (vitesse de déformation du fluide).

La viscosité du sang varie en fonction de la vitesse (ou de la contrainte) de cisaillement qu'il subit (c'est un fluide non-newtonien dont l'écoulement dépend des forces externes qui s'exercent sur lui) (Baskurt and Meiselman 2003). A faible cisaillement, la viscosité sanguine est très affectée par l'hématocrite (relation à la puissance 4) et par l'agrégation des globules rouges (Figure 27).

Plus il y a d'agrégats érythrocytaires, plus la viscosité sanguine est élevée (Baskurt and Meiselman 2003). Lorsqu'on augmente la vitesse/contrainte de cisaillement, les agrégats de globules rouges sont dispersés et on assiste à une diminution de la viscosité sanguine. Si la vitesse de cisaillement augmente encore, la viscosité sanguine continue à diminuer en raison d'une élongation plus importante des globules rouges (Figure 27)(Baskurt and Meiselman 2003). Cette relation vitesse de cisaillement – viscosité sanguine reflète les propriétés rhéofluidifiantes du sang.

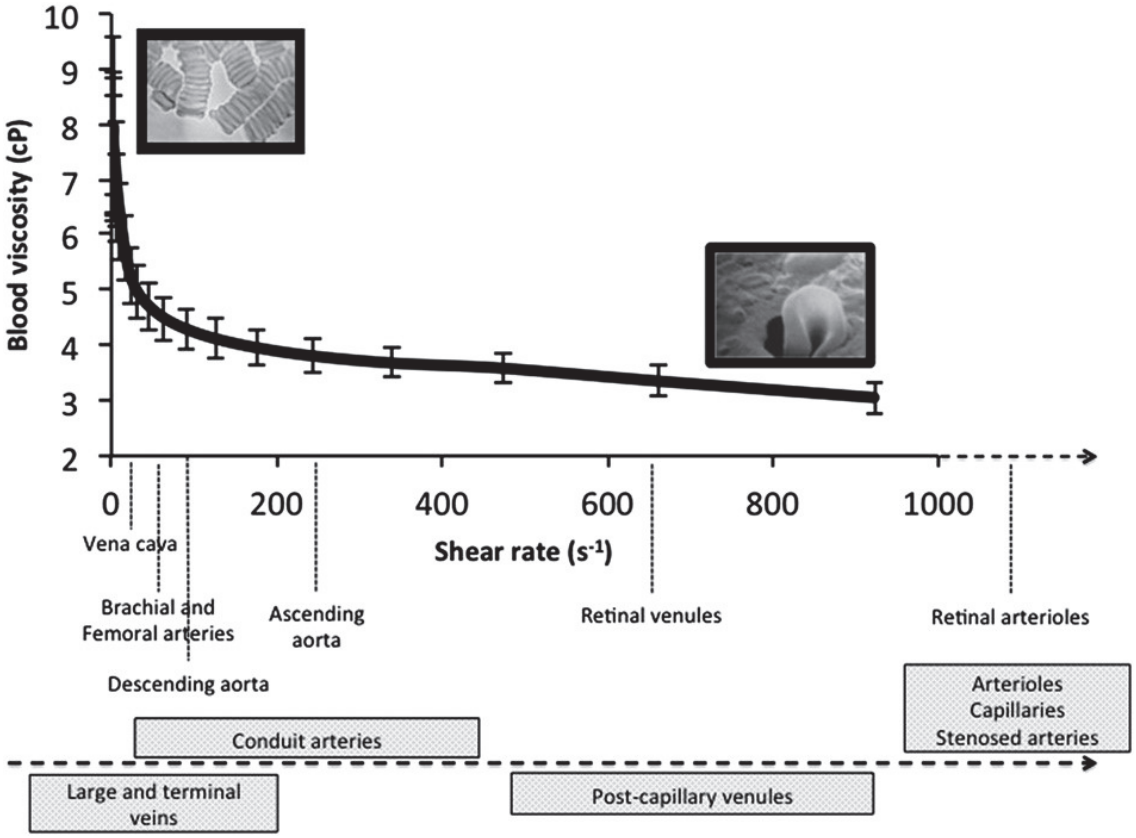


Figure 27. ***Effets de la déformabilité et de l'agrégation érythrocytaire sur la viscosité sanguine en fonction de la vitesse de cisaillement***

d'après Connes et al. 2016

La viscosité sanguine peut être également influencée par la viscosité plasmatique (Baskurt and Meiselman 2003). A l'inverse du sang, le plasma se comporte comme un fluide newtonien, c'est-à-dire que son écoulement n'est pas dépendant des forces extérieures qui s'exercent sur lui. Ainsi, sa viscosité ne dépend pas de la vitesse de cisaillement mais uniquement de la concentration des protéines dont il est composé (principalement les albumines, globulines,

lipoprotéines et le fibrinogène). En effet, ces différentes protéines asymétriques (excepté les albumines) peuvent augmenter la viscosité plasmatique en se plaçant perpendiculairement au sens de l'écoulement (Baskurt and Meiselman 2003). En situation de réponse inflammatoire aigue ou de désordre métabolique, la concentration de ces différentes protéines augmente, et donc l'augmentation de la viscosité plasmatique peut être un indicateur physiopathologique (Somer and Meiselman 1993).

De manière générale, nous pouvons dire que la viscosité sanguine est majoritairement influencée par les propriétés rhéologiques des globules rouges (déformabilité et agrégation érythrocytaire), l'hématocrite et la viscosité plasmatique.

b. Déformabilité des globules rouges

Le globule rouge, qui a la forme d'un disque biconcave d'une taille moyenne de 7µm, doit au cours de son existence traverser quelques milliers de fois des vaisseaux et capillaires sanguins de très fin calibre, parfois d'un diamètre trois fois inférieur à son propre diamètre. Il doit ainsi s'adapter à des conditions physiques et hémodynamiques extrêmes de la microcirculation. Pour ceci, le globule rouge possède une capacité de déformabilité importante, sous l'influence de trois paramètres : la viscosité intracytoplasmique, l'excès de surface du globule rouge par rapport à une sphère du même volume ainsi que des propriétés d'élasticité et de déformabilité de sa membrane (Connes and Boisseau 2010).

La fonction principale du globule rouge est de transporter l'oxygène, et ce grâce à l'hémoglobine qu'il contient. La viscosité intracytoplasmique est fonction de la concentration en hémoglobine du globule rouge et est souvent assez faible. L'excès de surface que présente le globule rouge lui permet de modifier sa forme afin de s'allonger au maximum pour traverser les plus fins capillaires. Enfin, les propriétés viscoélastiques de la membrane, essentiellement liées à l'état de la bicouche lipidique ainsi que du cytosquelette, module la déformabilité des GRs (Mohandas and Evans 1994). De façon intéressante, il a été montré que la quantité membranaire de cholestérol

diminuait la déformabilité du GR, et de fait que les statines permettaient de limiter cette rigidité membranaire (Forsyth et al. 2012). Ainsi, lorsque les GR sont plus rigides, leurs capacités de déformation, et donc de traverser des capillaires fins et leur fournir de l'oxygène, sont réduites (Kameneva et al. 1999). De la même manière, en limitant leur capacité de déformabilité, les GR vont réduire leur surface de contact avec la paroi des capillaires, ce qui va réduire le nombre de capillaires fonctionnels et ainsi favoriser une ischémie tissulaire (Kameneva et al. 1999).

c. Agrégation des globules rouges

L'agrégation érythrocytaire correspond à la capacité des globules rouges à se superposer les uns sur les autres et former des rouleaux linéaires (comme des assiettes qui s'empileraient) dans un premier temps, qui eux-mêmes se liant les uns aux autres forment des agrégats en trois dimensions (Baskurt and Meiselman 2010). Ce phénomène réversible de formation de rouleaux est en grande partie dû à la concentration plasmatique de fibrinogène, mais également de thrombospondine 1 et du facteur de von Willebrand comme récemment montré (Nader et al. 2017). Mais il est également largement contrôlé par la vitesse de cisaillement. En effet, dans les zones de faible vitesse de cisaillement, la formation d'agrégats érythrocytaires est favorisée alors que dans les zones de vitesse de cisaillement élevée, ces agrégats se dissocient. Parmi les conséquences de cette agrégation érythrocytaire, nous pouvons noter une réduction de la production de NO par l'endothélium et donc un effet sur la vasomotricité. En effet, l'augmentation de l'agrégation des globules rouges entraine la migration de ceux-ci au centre des vaisseaux sanguins. Ce phénomène est appelé le phénomène de migration axiale, provoquant la formation d'une couche appauvrie en cellules, adjacente à la paroi vasculaire, dont la viscosité est plus faible que dans la zone axiale où la concentration en globules rouges est accrue. Ainsi, la contrainte de cisaillement sur l'endothélium est réduite, ce qui conduit à la diminution de production de NO (Baskurt and Meiselman 2010). De la même manière, les processus d'agrégation érythrocytaire et de migration axiale provoquent la margination des leucocytes et

des plaquettes vers l'endothélium, favorisant ainsi le phénomène de diapédèse leucocytaire, largement impliqué dans le processus d'athérogénèse (Nash et al. 2008 ; Watts et al. 2013).

2. Évolution des paramètres hémorhéologiques dans le contexte de l'athérosclérose

De nombreuses études se sont intéressées à la relation entre les paramètres de la rhéologie sanguine et les maladies cardiovasculaires, en particulier l'athérosclérose dans les années 1980 et 1990. Les premières étapes de l'athérogénèse concernant la dysfonction endothéliale, il semble plausible que les caractéristiques du flux sanguin puissent jouer un rôle important dans l'initiation de l'athérosclérose. En effet, les plaques se développent au niveau des bifurcations du système artériel, où le flux sanguin est perturbé (Chiu and Chien 2011) : ainsi certains facteurs hémodynamiques peuvent jouer un rôle majeur. Au niveau de ces régions spécifiques, la contrainte de cisaillement (correspondant au produit de la vitesse de cisaillement et de la viscosité sanguine) devient oscillante favorisant ainsi la dysfonction endothéliale et le développement de l'athérosclérose (Davies 2009). En effet, la paroi endothéliale de ces régions pro-athérogènes présentent des caractéristiques telles qu'une augmentation de la perméabilité des macromolécules plasmatiques, une augmentation du renouvellement cellulaire (prolifération/apoptose) et une augmentation de l'adhérence des monocytes (Chiu and Chien 2011). Ainsi, l'ensemble de ces caractéristiques favorise des altérations de la morphologie et de la structure des cellules endothéliales (Zhou et al. 2014). Une adaptation inadéquate des cellules endothéliales en réponse à la contrainte de cisaillement a été montré pour jouer un rôle primordial dans le développement de l'athérosclérose (Cunningham and Gotlieb 2005). De plus, il a été montré qu'un flux sanguin non-laminaire provoque des altérations de réponses endothéliales, d'expression génique, d'arrangement du cytosquelette et d'adhésion leucocytaire conduisant à des dommages vasculaires et le développement de plaques d'athérosclérose (Figure 28) (Della-Morte and Rundek 2015).

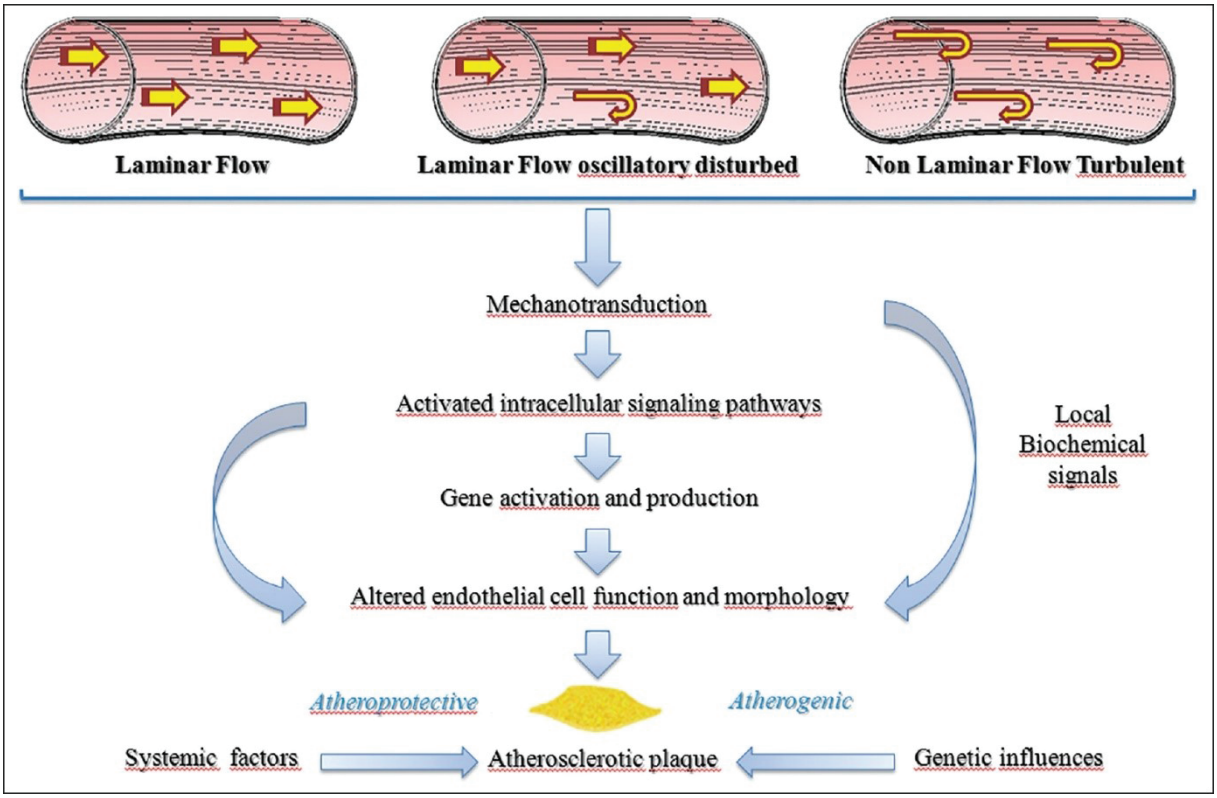


Figure 28. ***Influence de la contrainte de cisaillement sur le développement de l'athérosclérose***

D'après Della-Morte et Rundek, 2015

Nous pouvons donc ainsi dire que les propriétés hémorhéologiques, par l'intermédiaire de la viscosité sanguine, jouent un rôle dans l'initiation de l'athérogénèse et la dysfonction endothéliale (Figure 27).

a. Viscosité sanguine

Il a été montré à plusieurs reprises et avec différents types de sujets (sujets sains, patients hypertendus traités ou non, patients hypercholestérolémiques traités ou non) que la viscosité sanguine était un paramètre majeur causant le développement de plaque d'athérosclérose et la survenue d'évènements ischémiques majeurs (Kensey 2003). En effet, la viscosité du sang est positivement corrélée aux facteurs de risque cardiovasculaires favorisant le développement de la plaque d'athérosclérose comme l'hypertension (Smith et al. 1992 ; Fowkes et al. 1993 ; Devereux et al. 2000), l'hyperlipidémie (Lowe 1992), l'obésité (Dintenfass 1989), le tabagisme

(Ernst 1995), le diabète (Dintenfass 1989) et la concentration élevée en LDL-C (Lowe 1992; Sloop and Garber 1997).

Plusieurs études ont été réalisées chez des patients hypertendus montrant que la viscosité sanguine était 10% plus élevée chez ces patients par rapport à des sujets sains (Smith et al. 1992 ; Fowkes et al. 1993 ; Devereux et al. 2000). Une corrélation positive entre la viscosité sanguine et la pression artérielle a également été montré chez des patients présentant une hypertension moyenne non traitée alors qu'aucune relation n'a été montré chez des sujets sains (Letcher et al. 1981). Ce dernier résultat suggère alors que l'altération de la viscosité sanguine contribue significativement à l'augmentation des résistances périphériques, paramètre majeur de l'hypertension. De plus, Lowe et al. (2000) ont montré dans une étude de suivi de cohorte que la diminution de la concentration en lipoprotéines était associée à la diminution des viscosités sanguine et plasmatique chez des patients hypercholestérolémiques 1 an après le début d'un traitement aux statines. Cette réduction du taux de lipoprotéines n'était toutefois pas associée à une réduction de l'hématocrite, des globules blancs et du fibrinogène.

Enfin, plusieurs études ont démontré que les paramètres hémorhéologiques, et principalement la viscosité sanguine étaient des prédicteurs de maladies cardiovasculaires aussi forts que les facteurs de risque cardiovasculaires conventionnels (Lowe et al. 1997 ; Koenig et al. 1998). Plus précisément, Lowe et al. (1997) ont suggéré que la viscosité sanguine pouvait être un prédicteur d'évènements ischémiques aussi fort que la concentration en LDL-C et la pression artérielle diastolique dans une population âgée, et plus fort que le tabagisme. Récemment, il a été montré à plusieurs reprises que la viscosité sanguine était plus élevée chez des patients ayant subi un accident ischémique cérébral (Velcheva et al. 2006 ; Li et al. 2015 ; Totsimon et al. 2016) par rapport à des sujets sains ou patients asymptomatiques. En effet, Li et al. (2015) ont rapporté une augmentation significative de la viscosité sanguine en fonction de la survenue d'infarctus cérébral silencieux chez des patients diabétiques de type 2 et hypertendus. Ceci a alors été confirmé par Totsimon et al. (2016) et Velcheva et al. (2006) qui ont démontré une viscosité

supérieure chez des patients symptomatiques présentant une sténose de l'artère carotide, respectivement par rapport à des patients asymptomatiques vis-à-vis de l'AVC et/ou AIT, et des sujets sains.

b. Déformabilité des globules rouges

Comme nous l'avons précédemment évoqué, les propriétés de déformabilité du GR jouent un rôle prépondérant dans l'évolution de la viscosité du sang. Plusieurs études récentes se sont intéressées aux différences de déformabilité des GR de patients symptomatiques et asymptomatiques vis-à-vis de l'athérosclérose carotidienne et de l'AVC, et de sujets sains (Ionova 2003 ; Lee et al. 2006 ; Tikhomirova et al. 2011 ; Totsimon et al. 2016). Les patients symptomatiques présentaient des GR moins déformables par rapport aux patients asymptomatiques ou sujets sains (Ionova 2003 ; Tikhomirova et al. 2011 ; Totsimon et al. 2016).

En plus de jouer un rôle important dans l'évolution de la viscosité sanguine, l'état de déformabilité des GR a un impact direct sur la microcirculation. Les anomalies de la microcirculation semblent constituer un des premiers signes de maladies cardiovasculaires (Levy et al. 2008). En effet, il a été montré chez des patients souffrant de désordres cérébrovasculaires et chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique, une altération de la microcirculation ainsi qu'une diminution de la déformabilité érythrocytaire, contribuant ainsi à l'aggravation des symptômes (Tikhomirova et al. 2011, 2017). Plusieurs paramètres impliqués dans le développement et la progression de l'athérosclérose ont été montré pour altérer la déformabilité des GR tels que le stress oxydant (Mohanty et al. 2014), l'inflammation (par l'activation des leucocytes polymorphonucléaires) (Baskurt and Meiselman 2003), ou encore la présence de LDL oxydés (Wang et al. 2009).

c. Agrégation des globules rouges

L'étude de l'évolution de l'agrégation érythrocytaire dans le contexte de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires était prédominante dans les années 90. C'est à ce moment-là que

plusieurs études ont démontré que des patients symptomatiques vis-à-vis d'évènements ischémiques présentaient une agrégation des GR supérieure à celle des patients asymptomatiques (Koenig and Ernst 1992; Pfafferott et al. 1999). Ces observations ont alors été confirmées dans les années 2000, en particulier chez des patients victimes d'un AVC ou d'un AIT (Zeltser et al. 2001 ; Ionova 2003 ; Tikhomirova et al. 2011) par rapport à des patients asymptomatiques ou des contrôles sains. De la même manière que pour la déformabilité des GR, il a été montré que le stress oxydant et l'inflammation (notamment par l'intermédiaire des enzymes protéolytiques jouant un rôle crucial dans la dégradation de la chape fibreuse) augmentaient l'agrégabilité des GR (Baskurt and Meiselman 2003; Hierso et al. 2014). L'ensemble de ces études montre le potentiel rôle de l'agrégation des GR dans les phénomènes de rupture de plaque à l'origine d'évènements ischémiques majeurs. Néanmoins, il est intéressant de noter qu'un traitement hypolipidémiant par les statines n'avait pas d'impact sur les propriétés d'agrégation des GR alors qu'il permettait d'améliorer les propriétés de déformabilité érythrocytaire et ainsi la viscosité sanguine chez des patients atteints de maladies cérébrovasculaires chroniques (Szapary et al. 2004).

Ainsi, l'ensemble de ces informations laisse à penser que l'analyse de paramètres hémorhéologiques pourrait favoriser l'identification de patients à risque pour l'athérosclérose et autres maladies cardiovasculaires.

CHAPITRE 5 : EFFETS DU NIVEAU D'ACTIVITE SUR LES PARAMETRES BIOLOGIQUES DE L'ATHEROSCLEROSE

A. ACTIVITÉ PHYSIQUE

L'activité physique (AP), comme défini par l'OMS, correspond à « tout mouvement corporel produit par les muscles qui requiert une dépense d'énergie – ce qui comprend les mouvements effectués en travaillant, en jouant, en accomplissant les tâches ménagères, en se déplaçant et pendant les activités de loisirs », impliquant une élévation des besoins énergétiques et ayant une durée limitée dans le temps (Caspersen et al. 1985). Il est important dans notre contexte de différencier les notions d'activité physique et d'activité sportive. En effet, l'activité sportive est un sous-ensemble de l'AP qui correspond à un ensemble de mouvement structurés et planifiés, pouvant impliquer la notion de compétition (Khan et al. 2012).

L'AP est reconnue pour avoir des effets distincts, les effets aigus et chroniques. Ces deux notions se différencient par la répétition ou non d'activité physique. En effet, l'AP aigue engendre des effets immédiats, ou à court terme, suite à une seule période d'activité physique. Ces effets transitoires, qui s'interrompent peu de temps après l'arrêt de l'activité, entraînent des modifications hémodynamiques, endocrines et métaboliques temporaires dans le but de restaurer l'homéostasie (Saltin 1985). A l'inverse, l'AP chronique engendre des effets durables, ou à long terme, suite à la répétition de périodes d'AP, provoquant des adaptations physiologiques, notamment sur les fonctions musculaire, pulmonaire et cardiovasculaire.

Au travers de ce chapitre et ce travail de thèse, nous allons nous intéresser spécifiquement aux effets de l'AP chronique sur différents paramètres intervenant dans l'athérosclérose.

1. Effets sur le stress oxydant et l'inflammation

Il est maintenant bien admis que l'activité physique régulière joue un rôle important dans l'amélioration de la santé vasculaire et cellulaire, par l'amélioration des défenses antioxydantes et de la réponse immunitaire (He et al. 2016). La réduction du stress oxydant induite par l'AP chronique a tout d'abord été montré dans la population générale (Miyazaki et al. 2001; Elosua et al. 2003a; Bloomer and Fisher-Wellman 2008). En effet, Elosua et al. (2003) ont démontré une amélioration des capacités antioxydantes après 16 semaines d'entrainement aérobie chez de jeunes adultes sédentaires tandis que Bloomer and Fisher-Wellman (2008) montraient que des sujets entrainés présentaient un stress oxydant au repos moindre par rapport à des sujets sédentaires. De plus, Miyazaki et al. (2001) ont indiqué que pratiquer une AP régulière permettait de limiter le stress oxydant induit par un exercice de haute intensité.

Cet effet bénéfique de l'AP chronique sur le stress oxydant a également été démontré chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires, à risque de développement de plaque et atteints d'athérosclérose (Higashi and Yoshizumi 2004; Huang et al. 2015 ; Dopheide et al. 2015 ; Walker et al. 2016 ; Steven et al. 2017). De nombreuses études ont été réalisées chez des patients présentant de l'athérosclérose au niveau fémoral, montrant à la fois une augmentation des ROS en cas de maladie des artères périphériques (Walker et al. 2016), et une réduction du stress oxydant associé par l'AP (Dopheide et al. 2015 ; Gardner et al. 2016, 2017 ; Steven et al. 2017). Le même constat a également été observé chez des patients hypertendus (Higashi and Yoshizumi 2004) et obèses (Huang et al. 2015).

D'un point de vue mécanistique, l'AP a été montré pour améliorer les capacités antioxydantes et améliorer la biodisponibilité du NO (Rush et al. 2005). En effet, l'AP chronique améliore l'activité de la SOD (Rowiński et al. 2013; Bouzid et al. 2015) qui est l'enzyme impliquée en premier lieu dans la protection contre les ROS (Figure 21), chez des personnes âgées. L'AP a également été montrée pour améliorer l'activité de la catalase (Rowiński et al. 2013; Fraile-Bermúdez et al. 2015), en particulier chez des sujets moins âgés (Rowiński et al. 2013) et en fonction de l'intensité

(Fraile-Bermúdez et al. 2015). De la même manière, l'AP chronique améliore l'activité de l'enzyme GPx (Rowiński et al. 2013; Bouzid et al. 2015; Fraile-Bermúdez et al. 2015) chez des sujets âgés donc potentiellement à risque d'athérosclérose. Et l'AP chronique a également été montré pour améliorer la régulation vasculaire notamment via le métabolisme du NO (Pialoux et al. 2009a ; Szostak and Laurant 2011), paramètre primordial dans cette pathologie.

Similairement au stress oxydant, l'inflammation est connue pour être impactée par l'AP chronique. La diminution de l'inflammation par l'AP régulière a tout d'abord été montré dans la population générale comme l'ont montré Mattusch et al. (2000), Hamer et al. (2012) ainsi que (Parsons et al. 2017). Ces 3 études ont ainsi montré à travers 2 biomarqueurs généraux (CRP et IL-6), une baisse de l'inflammation grâce à une pratique d'AP chronique, recensée à l'aide de questionnaire (Hamer et al. 2012), accéléromètre (Parsons et al. 2017) et programme d'entrainement en endurance (Mattusch et al. 2000).

Dans un second temps, cette association positive a été étudiée dans le contexte de pathologies et d'athérosclérose. Tout d'abord, Pischon et al. (2003) ont rapporté une association entre l'AP chronique et une inflammation systémique moindre par l'intermédiaire des biomarqueurs CRP, IL-6 et des récepteurs du TNF, dans une cohorte de patients obèses, à risque d'athérosclérose. De la même manière, Lira et al. (2014) ont rapporté l'amélioration de l'inflammation et des dyslipidémies par l'AP, mécanismes liés au développement de l'athérosclérose. Enfin, plusieurs études se sont intéressées à la relation entre l'inflammation et l'activité physique directement chez des patients atteints d'athérosclérose (Gleeson et al. 2011 ; Pinto et al. 2012 ; Palmefors et al. 2014 ; Coelho Junior et al. 2016). Toutes ces études s'accordent à dire que l'AP régulière joue un rôle bénéfique sur l'inflammation dans le contexte de l'athérosclérose, ayant ainsi d'importantes implications cliniques.

D'un point de vue mécanistique, l'AP chronique pourrait agir à différents niveaux dans la réduction de l'inflammation. En effet, pratiquer une AP régulièrement permettrait de réduire la

masse graisseuse viscérale provoquant ainsi la réduction de production de cytokines pro-inflammatoires par le tissu adipeux (TNF, IL-6, IL-18, CCL2, CXCL5) ou adipokines (Gleeson et al. 2011). L'AP chronique pourrait augmenter la production d'IL-6 par les muscles squelettiques contractés entrainant alors une augmentation des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-1RA (Gleeson et al. 2011). Une diminution de l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux pourrait également expliquer la diminution de l'inflammation par l'AP, limitant alors la réponse immunitaire et inflammatoire subséquente (Gleeson et al. 2011). Enfin, l'AP chronique pourrait réduire la quantité de monocytes pro-inflammatoires dans le sang au repos, expliquant ainsi la diminution de l'infiltration des monocytes dans les tissus ainsi que la réponse inflammatoire associée (Gleeson et al. 2011).

2. Effets sur les paramètres hémorhéologiques

Tout comme le stress oxydant et l'inflammation, les principaux paramètres hémorhéologiques, participant au développement et à la progression de la pathologie, sont influencés par l'AP chronique (Connes et al. 2013). Ce constat a été fait, au même titre que le stress oxydant et l'inflammation, tout d'abord dans la population générale, et confirmé par la suite dans des populations de patients atteints de maladies cardiovasculaires.

Tout d'abord, il a été montré que la viscosité sanguine était diminuée par la pratique d'une AP régulière (Church et al. 2002). Ceci est expliqué par le phénomène d'auto-hémodilution, ou augmentation du volume plasmatique chronique engendrée par la pratique d'une activité physique régulière. L'expansion plasmatique observée permet alors une diminution de l'hématocrite et de la viscosité plasmatique, ce qui favorise donc une baisse de la viscosité sanguine (Brun et al. 1998). Et ce constat a été fait à la fois chez des sujets sains par la comparaison entre athlètes et sédentaires (Ernst 1987) et chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires après un entrainement aérobie de 24 semaines (Sandor et al. 2014).

La diminution de la viscosité sanguine par l'AP chronique peut également être expliquée par des modifications des propriétés mécaniques des GR : déformabilité (Sandor et al. 2014) et agrégation (Sandor et al. 2014 ; Pabisiak et al. 2015). L'agrégation érythrocytaire a été montrée à plusieurs reprises pour être diminuée grâce à l'AP chronique (Dintenfass 1989 ; Simmonds et al. 2012 ; Connes et al. 2013 ; Sandor et al. 2014 ; Pabisiak et al. 2015) chez des sujets sains et des patients atteints de maladies cardiovasculaires. Cette diminution de l'agrégation des GR peut être expliquée par la diminution de la concentration en fibrinogène induite par l'exercice physique comme précédemment montré par Pabisiak et al. (2015). De plus, la diminution de la concentration de fibrinogène influence également la viscosité plasmatique et ainsi la viscosité sanguine. Concernant l'évolution de la déformabilité des GR, il est important de différencier l'AP aigue de l'AP chronique. Il n'existe pas à l'heure actuelle, de consensus concernant l'évolution de la déformabilité des GR induite par l'AP aigue. En effet, alors que certains auteurs comme Connes et al. (2009) et Wahl et al. (2012) ont rapporté une augmentation de la déformabilité érythrocytaire, d'autres auteurs ont montré que l'AP aigue entrainait une diminution de la déformabilité érythrocytaire (Ajmani and al. 2003 ; Yalcin and al. 2003). Il n'existe que peu d'études s'intéressant aux effets de l'AP chronique sur la déformabilité des GR. Parmi celles-ci, les études transversales s'accordent à montrer une déformabilité érythrocytaire supérieure chez les athlètes comparés à des sujets sédentaires (Ernst and Matrai 1987; Smith et al. 1999a). Les études longitudinales, quant à elles, ne proposent pas de consensus. En effet, alors que Ernst and Matrai (1987) ont montré une augmentation de la déformabilité érythrocytaire suite à un entrainement en endurance, Simmonds et al. (2012) ont rapporté une diminution de cette déformabilité et Pabisiak et al. (2015) n'ont pas observé d'évolution après un entrainement aérobie. Ce manque de consensus peut être expliqué par différents facteurs comme la différence entre les techniques de mesure de la déformabilité érythrocytaire entre les études et également la différence entre les protocoles et les modalités de mesure d'AP (questionnaires, entrainement aérobie, niveau d'AP). Théoriquement, l'AP devrait permettre un renouvellement plus régulier

des GR sous l'influence de l'érythropoïétine (EPO) (Hu and Lin 2012). Les GR âgés sont plus fragiles et rigides tandis que les nouveaux GR sont plus déformables (Wahl et al. 2012).

3. Effets sur les biomarqueurs d'instabilité de la plaque

L'association positive entre l'AP chronique et la réduction de l'incidence des maladies cardiovasculaires est maintenant bien établie, en particulier la sténose de l'artère carotidienne (Stein et al. 2015) et la maladie cardiaque coronarienne (CHD) (Thompson et al. 2003 ; Schnohr et al. 2017). De nombreuses études ont déterminé que des niveaux d'AP modérés à élevés prévenaient des évènements cardiovasculaires (Berlin and Colditz 1990; Rauramaa et al. 1995 ; Sofi et al. 2008), décrivant une relation dose-réponse (K E Powell et al. 1987 ; Stamatakis et al. 2009). L'AP joue un rôle protecteur dans la prévention primaire et la prévention secondaire. De plus, plusieurs essais cliniques portant sur l'AP ont démontré une régression des lésions existantes (Bowles and Laughlin 2011). En effet, l'AP chronique a été montré pour réduire la majorité des processus physiologiques impliqués dans la pathogénèse des maladies cardiovasculaires (stress oxydant, inflammation, adhérence vasculaire) (Rush et al. 2005 ; Pialoux et al. 2009a ; Szostak and Laurant 2011), à l'inverse de la réponse à court terme de l'AP aigue (Elosua et al. 2003a; Delaney and Spark 2016). D'autre part, le type d'activité pratiquée peut engendrer différentes évolutions des marqueurs d'athérosclérose. Agrotou et al. (2013) ont montré que la pratique régulière de sport de force (haltérophilie) était associée avec une diminution de la vasodilatation dépendante du flux sanguin (FMD) et avec une augmentation de l'épaisseur intima-media de la carotide (cIMT), deux marqueurs précoces de l'athérosclérose. A l'inverse, un exercice d'endurance chronique, comme l'entrainement pour un marathon, était capable de réduire plusieurs facteurs de risque cardiovasculaires (CRP, lipides sanguins, cholestérol, IMC) (Taylor et al. 2014). Hambrecht et al. (2004) ont démontré que la thérapie combinée AP et régime alimentaire était plus efficace que la chirurgie d'angioplastie sur la prévention d'évènements ischémiques chez des patients CHD stables, et que cette thérapie pouvait être 3500$ moins coûteuse par patient. L'ensemble de ces résultats confirment

l'importance de l'AP chronique dans la prévention de l'athérosclérose. Bowles and Laughlin (2011) ont alors émis l'hypothèse de plusieurs mécanismes plausibles, incluant une fonction endothéliale améliorée, l'atténuation de la progression de la plaque ainsi que la stabilisation des plaques vulnérables à risque de rupture, la réduction de la demande en oxygène myocardique, la diminution de la thrombose, et la diminution de médiateurs inflammatoires produits par les muscles squelettiques et le tissu adipeux.

Plusieurs études se sont intéressées aux effets de l'AP régulière sur les marqueurs biologiques de l'athérosclérose afin de mieux comprendre le rôle bénéfique de l'AP sur la pathologie. Des paramètres anatomiques tels que le volume de plaque, cIMT ou la rugosité de surface, semblent être convenables pour prédire la survenue d'évènements cardiovasculaires comme Forbes et al. (2016) ont récemment montré une association positive entre la réduction du volume de plaque coronarienne et la réduction d'évènements cardiovasculaires. L'AP a été montré pour réduire des paramètres anatomiques de la plaque dans plusieurs études. Nishitani-Yokoyama et al. (2015) ont rapporté une corrélation négative significative entre la variation du volume de plaque coronarienne et l'AP quotidienne. Ce résultat est confirmé par Lakka et al. (2001) qui ont reporté dans une étude de suivi de 4 ans, une association inverse entre VO_2max et le développement du cIMT (Rauramaa et al. 1995), la taille de plaque carotidienne et la rugosité de surface, soulignant ainsi le rôle préventif de l'AP sur les évènements cardiovasculaires. De manière intéressante, Nishitani-Yokoyama et al. (2015) n'ont pas trouvé de différence de variation du volume de plaque entre des patients symptomatiques impliqués ou non dans un programme de rééducation cardiaque en phase II incluant 6 mois d'entrainement aérobie.

La calcification de l'artère coronaire (CAC) semble être un important facteur de risque. Desai et al. (2004) ont démontré une forte relation entre l'AP et la prévalence de calcification avancée dans une étude de cohorte impliquant 779 patients présentant plus de deux facteurs de risque cardiovasculaires (HTA, obésité, hypertriglycéridémie, et basse concentration de HDL-C). Ceci a été récemment confirmée dans une étude de cohorte impliquant 2107 hommes, montrant que

des hauts niveaux d'AP pouvaient atténuer CAC et cIMT (Jae et al. 2016). Ces auteurs ont alors démontré une relation inverse entre niveaux d'AP et degré absolu de CAC, émettant alors l'hypothèse que l'AP régulière pouvait réduire les facteurs de risque métaboliques et ainsi moduler ou retarder la calcification de plaque. Ce résultat a été confirmé par (Kwaśniewska et al. 2014) et Wilund et al. (2008) chez des hommes uniquement.

Le paramètre anatomique le plus utilisé à l'heure actuelle pour détecter et quantifier l'athérosclérose est le cIMT. Plusieurs études ont reporté que le cIMT était capable de prédire l'athérosclérose coronarienne. Mais, comme décrit par Bots et al. (2007), cette relation apparait fragile à cause de la variabilité du développement de l'athérosclérose et des mesures du cIMT. Différents auteurs ont émis l'hypothèse que des modifications de l'hygiène de vie induites par l'intervention en AP ne devraient pas être suffisantes pour limiter la progression du cIMT et de la plaque d'athérosclérose dans une population saine (Tanaka et al. 2002 ; Rauramaa et al. 2004) et chez des patients cardiovasculaires (Anderssen et al. 2005 ; Chan et al. 2006). Tanaka et al. (2002) ont trouvé, dans un groupe d'hommes sains de 18-77 ans, que le cIMT ne différait pas entre les sédentaires et les entrainés en endurance, comme confirmé par Gori et al. (2015). Ils ont tous deux montré que le cIMT était relatif à l'âge mais pas à la quantité d'AP pratiquée par semaine. Il est important de détailler que dans ces deux études transversales, l'évaluation de l'AP a été faire par auto-questionnaires. Cependant, Ferreira et al. (2003) ont réalisé un suivi de VO_2max dans un groupe de 154 adolescents et 118 sujets adolescents-adultes. Aucune différence de cIMT n'a été trouvé entre les trois groupes d'évolution de VO_2max (diminution, stabilité ou augmentation) après ajustement des variables. Cette dernière étude pose la question de l'utilisation du cIMT comme marqueur adéquat de l'effet bénéfique de l'AP sur le développement de l'athérosclérose.

Les effets de l'exercice sur la pression artérielle ont également bien été étudiés. Thompson et al. (2003) ont rapporté une réduction significative des PAS et PAD avec l'exercice dans une population totale de 2674 patients, incluant des sujets normotendus et hypertendus. Ils ont pu

observer une réduction d'un facteur 3 chez les sujets hypertendus par rapports aux normotendus, suggérant ainsi que l'AP pouvait être utilisée comme traitement. De plus, l'effet positif de l'exercice aérobie régulier sur la fonction vasomotrice et les propriétés artérielles, en particulier la rigidité artérielle, est bien connu (Tanaka et al. 1998). Horta et al. (2015) ont démontré que les sujets actifs, suivant les recommandations internationales de 30min/jour avaient une rigidité artérielle moindre alors que le temps de sédentarité était associé à cette rigidité artérielle. De plus, il apparait que la rugosité artérielle (i.e. irrégularités de l'IMT mesurées par scanner à ultrasons) était plus sensible que le cIMT pour caractériser les modifications de la paroi artérielle (Sandrock et al. 2008). De manière intéressante, Luedemann et al. (2002) ont rapporté que les sujets qui n'ont jamais fumé avaient un cIMT et une sténose de l'artère carotide commune réduite par rapport aux fumeurs.

La rigidité artérielle est une des conséquences de la dysfonction endothéliale. Le NO est l'acteur majeur du tonus vasomoteur. L'athérogénèse coronarienne est caractérisée par la détérioration progressive de la fonction endothéliale, en particulier par la voie de signalisation du NO favorisant et maintenant l'environnement pro-oxydatif et pro-inflammatoire. Il est bien connu que l'AP régulière améliore la production de NO (Skrypnik et al. 2014), elle peut donc être une thérapie potentielle de la dysfonction endothéliale. Hambrecht et al. (2000) ont étudié les effets de 4 semaines d'entrainement physique sur la dysfonction endothéliale chez 19 patients d'athérosclérose carotidienne asymptomatiques sans facteurs de risque métaboliques (diabète, obésité, HTA, hypercholestérolémie et tabagisme). Ils ont pu observer que l'entrainement aérobie améliorait la vasodilatation endothéliale et limiter la vasoconstriction en réponse à l'acétylcholine.

B. SÉDENTARITÉ

La sédentarité, ou comportement sédentaire, correspond au temps accumulé en position assise ou allongée pendant la période d'éveil au cours de laquelle la dépense énergétique est égale à celle de repos (Owen et al. 2010b). Adopter un comportement sédentaire représente à l'heure

actuelle l'un des 10 facteurs de risque de mortalité dans le monde, et plus particulièrement un facteur de risque majeur des maladies cardiovasculaires, selon l'OMS. La sédentarité est à différencier de la notion d'inactivité physique. En effet, l'inactivité physique représente l'incapacité à respecter les recommandations de pratique d'AP, ou pratiquer une quantité insuffisante d'AP d'intensité modérée à intense (Haskell et al. 2007). Ainsi, il est possible pour un individu à la fois de pratiquer une quantité suffisante d'AP modérée et d'adopter un comportement sédentaire de longue durée au cours d'une même journée (Owen et al. 2010a). Toutefois, il a été rapporté que lorsque le temps de sédentarité était entrecoupé par des phases actives (i.e. se lever et marcher quelques minutes toutes les heures), l'effet délètère de la sédentarité continue était limité (associations bénéfiques avec le tour de taille, l'IMC, les triglycérides et le glucose) (Owen et al. 2010b).

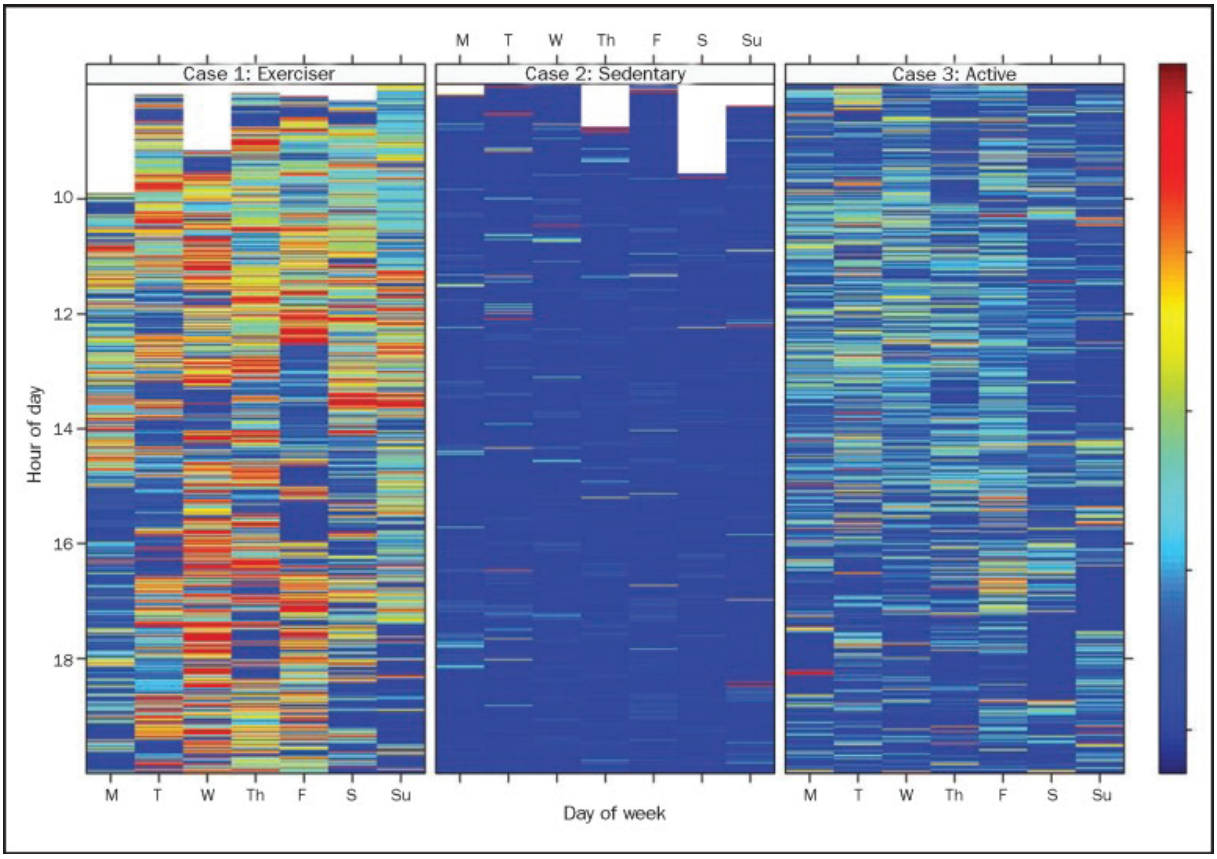


Figure 29. ***Profils d'activités quotidiennes découlant de données d'accéléromètres (profils d'une personne respectant les recommandations d'AP, d'une personne sédentaire, et d'une personne entrecoupant son temps de sédentarité)***
d'après Owen et al. 2010b

1. Effets sur le stress oxydant et l'inflammation

Bien que l'effet bénéfique de l'AP sur la santé vasculaire, le stress oxydant et l'inflammation soit maintenant bien établi, peu d'études ont été réalisées sur l'effet d'un comportement sédentaire pathologique sur ces mêmes paramètres. En effet, la sédentarité extrême est un problème de santé publique émergeant induit par l'urbanisation croissante. Néanmoins, très récemment, Wirth et al. (2017) ont rapporté les principaux biomarqueurs associés à un comportement sédentaire dans une population âgée, au sein d'une revue rassemblant 26 études transversales. Ils ont ainsi pu observer le lien entre certains marqueurs de l'inflammation comme la CRP, le fibrinogène, l'IL-6 et le TNF-α avec la sédentarité. Cette revue confirme les résultats d'études précédentes établissant l'association d'un comportement sédentaire avec la concentration en CRP (Healy et al. 2011 ; Gennuso et al. 2013 ; Howard et al. 2015 ; Farah et al. 2016) et en fibrinogène (Farah et al. 2016). Ainsi, bien que l'ensemble de ces études rapportent un effet néfaste de la sédentarité sur l'inflammation, il est important de noter que seuls des marqueurs très généraux (CRP, fibrinogène) ont été mesurés. Il serait intéressant à ce point, de confirmer ces résultats à l'aide de marqueurs plus spécifiques de l'athérosclérose, notamment des marqueurs inflammatoires associés à la fonction endothéliale (Carter et al. 2017) et par le biais d'études longitudinales.

Concernant l'effet de la sédentarité sur l'évolution du stress oxydant, le même constat d'un nombre faible d'études réalisées est fait. Néanmoins, la production de ROS vasculaires activée par la production de cytokines pourrait expliquer le lien entre la sédentarité et le risque de développer une maladie cardiovasculaire (Zhang et al. 2010). Carter et al. (2017) rapportent dans leur revue, une seule étude analysant l'effet d'un traitement antioxydant sur la fonction endothéliale après un comportement sédentaire. En effet, Thosar et al. (2015) ont observé la réduction de l'altération de la fonction endothéliale par l'ingestion de vitamine C lors d'un comportement sédentaire, suggérant le rôle potentiel des ROS dans l'impact de la sédentarité pathologique sur la santé vasculaire. Plus spécifiquement, Bartfay et Bartfay (2014) ont démontré un stress oxydant plus élevé chez des femmes ménopausées sédentaires par rapport à des

femmes ménopausées actives, par l'intermédiaire de biomarqueurs de la peroxydation lipidique (MDA et HNE) et du fer (fer sérique et ferritine). Ils ont également démontré une diminution de l'activité de GPx chez les femmes sédentaires par rapport aux femmes actives. Bouzid et al. (2014) ont également montré une plus forte augmentation du taux de MDA après un effort chez des sujets sédentaires âgés vis-à-vis de sujets actifs âgés, ainsi qu'une activité diminuée de SOD au repos chez les sédentaires. De la même manière que pour l'inflammation, ces résultats ont besoin d'être confirmés dans une population générale et dans une population de patients atteints de maladies cardiovasculaires.

2. Effets sur les paramètres hémorhéologiques

A l'heure actuelle, l'effet d'un comportement sédentaire sur les paramètres hémorhéologiques dans le contexte de l'athérosclérose n'a pas été clairement étudié, au même titre que dans la population générale. En effet, le peu d'études qui pourraient potentiellement apporter des informations sur cette relation rapportent des différences d'évolution de certains paramètres hémorhéologiques chez des patients sédentaires participant ou non à un programme d'activité physique (Aloulou et al. 2006 ; Varlet-Marie et al. 2013 ; Diaw et al. 2015). Néanmoins, ces études ne donnent pas d'informations relatives sur le degré de sédentarité de ces patients. Ainsi, il semblerait intéressant à ce point, d'évaluer l'impact d'un comportement sédentaire excessif, comme observé dans notre population de patients souffrant d'athérosclérose, sur la viscosité du sang et les propriétés de déformabilité et d'agrégation érythrocytaire.

3. Effets sur les biomarqueurs d'instabilité de la plaque

La sédentarité est un facteur de risque cardiovasculaire émergeant, causée en grande partie par le développement industriel favorisant les déplacements en voiture, le temps passé devant l'ordinateur ou la télévision et ainsi limitant la pratique d'activité physique d'intensité modérée. Durant la dernière décennie, plusieurs études se sont intéressées à l'impact d'un comportement sédentaire sur la santé cardiovasculaire (Schmidt-Trucksäss 2016; Loprinzi and Addoh 2016),

comportement considéré comme pathologique au-delà du seuil de 8h/jour et accentuant la mortalité cardiovasculaire (Kim et al. 2013 ; Schmid et al. 2015 ; Prince et al. 2016).

Tout d'abord, plusieurs études se sont intéressées à l'association entre la sédentarité et les marqueurs des différents facteurs de risque cardiovasculaires (obésité, hypertension, diabète, dyslipidémie) ou paramètres biologiques impliqués dans l'athérogénèse. Ainsi, il a été montré à plusieurs reprises l'association positive de la sédentarité et du poids, de l'IMC et du tour de taille (Healy et al. 2011 ; Gennuso et al. 2013 ; Nang et al. 2015 ; Leischik et al. 2015 ; Prince et al. 2016 ; Wirth et al. 2017) chez des sujets adultes, confirmant alors la relation entre sédentarité et obésité. La relation entre la sédentarité et l'hypertension a également été bien étudiée, montrant une augmentation de la PAS et PAD en situation de sédentarité pathologique (Power et al. 2014 ; Nosova et al. 2014 ; Nang et al. 2015 ; Wirth et al. 2017). Ensuite, certains auteurs ont démontré l'association positive entre un comportement sédentaire et des marqueurs du diabète tels que les niveaux de glucose, d'insuline et d'hémoglobine glyquée HbA1c (Healy et al. 2011 ; Gennuso et al. 2013 ; Nang et al. 2015 ; Leischik et al. 2015 ; Wirth et al. 2017). Enfin, il a été démontré le lien entre la sédentarité et les dyslipidémies, notamment par l'intermédiaire des concentrations en HDL-C, LDL-C et TG (Healy et al. 2011 ; Gennuso et al. 2013 ; Power et al. 2014 ; Nang et al. 2015 ; Leischik et al. 2015 ; Prince et al. 2016).

Il est ainsi bien démontré qu'un comportement sédentaire peut influencer de manière délétère la survenue de plaque d'athérosclérose (Loprinzi and Addoh 2016) par l'intermédiaire de l'ensemble de ses facteurs de risque (Carter et al. 2017). Néanmoins, certaines études se sont intéressées spécifiquement aux biomarqueurs de l'athérosclérose, et aux biomarqueurs de l'instabilité de plaque, utilisés jusqu'à présent. Ainsi, plusieurs études ont montré un lien entre la sédentarité et des marqueurs tels que la concentration en LDLox, la résistance artérielle et le CAC, comme déjà utilisé pour l'analyse de l'effet de l'AP (Bjork et al. 2012 ; Nosova et al. 2014 ; Nang et al. 2015). Le comportement sédentaire est notamment mesuré par le temps passé devant la télévision et en position assise soit par questionnaire soit à l'aide d'accéléromètre. De plus,

comme pour l'AP, le principal marqueur de l'athérosclérose utilisé à l'heure actuelle est le cIMT. Plusieurs études s'accordent à dire que la sédentarité est positivement associée à l'évolution du cIMT (Kozàkovà et al. 2010; Leischik et al. 2015; García-Hermoso et al. 2015; Diaz et al. 2016). Ainsi, les occupations sédentaires favorisent la survenue de plaques d'athérosclérose, ainsi que leur risque de rupture. Le comportement sédentaire étant indépendant de la quantité d'AP pratiquée, il est maintenant important de promouvoir le message qu'une quantité adéquate d'AP est vitale pour la Santé mais que réduire le temps de comportement sédentaire l'est tout autant.

PARTIE 3 – CONTRIBUTION PERSONNELLE

OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE TRAVAIL

Il a été montré durant la dernière décennie qu'environ 60% des évènements cardiovasculaires liés à la carotide étaient expliqués par la rupture de plaque résultant de l'instabilité des plaques athéroscléreuses. La prévention primaire de l'athérosclérose est aujourd'hui très limitée, faute de biomarqueurs prédictifs de la déstabilisation de plaque efficaces. Les principaux facteurs d'instabilité actuellement connus sont l'hémorragie intraplaque, la néovascularisation et l'accumulation excessive de macrophages dans la plaque, chacun de ces paramètres étant exacerbés par un environnement pro-oxydant et pro-inflammatoire chronique. De plus, comme nous l'avons détaillé dans la revue de littérature (cf PARTIE 2 – Chapitre 5), il a été montré que la sédentarité pouvait augmenter la survenue de l'athérosclérose alors qu'il est aujourd'hui clairement reconnu que l'activité physique réduit l'incidence des maladies cardiovasculaires et des évènements ischémiques cardiaques. Enfin, au regard du ratio bénéfice/rique de la CEA, la population de patients asymptomatiques pour l'AVC avec une plaque carotidienne importante mais non-opérés est de plus en plus importante. Ce travail de thèse vise donc à apporter des éléments de réponse quant aux effets néfastes de la sédentarité et aux effets bénéfiques de l'activité physique sur les facteurs de risque à l'origine de la déstabilisation de la plaque, en vue d'améliorer la prévention primaire de patients asymptomatiques à risque d'AVC.

Deux principales hypothèses ont animé ce travail de thèse :

1/ la sédentarité, qui est associée à la fois à une augmentation de l'incidence de maladies cardiovasculaires et de marqueurs de la santé cardio-métabolique (pression artérielle, LDL-C, TG) pourrait accentuer la prévalence de facteurs histologiques, systémiques et hémorhéologiques à l'origine de l'instabilité de la plaque d'athérosclérose carotidienne.

2/ l'activité physique, qui est connue à l'inverse pour limiter l'incidence de la pathologie et réduire des facteurs impliqués dans l'athérogénèse tels que le stress oxydant, l'inflammation ou encore l'adhérence vasculaire, pourrait limiter la prévalence de ces différents facteurs d'instabilité de plaque.

Quatre études sont présentées dans cette partie afin d'apporter des éléments de réponse à ces deux hypothèses de travail. Dans un premier temps, une étude de cohorte (études 1 et 4) est utilisée dans le but de mettre en lumière les associations entre activité physique, sédentarité et prévalence de facteurs histologiques, systémiques et hémorhéologiques à l'origine de l'instabilité de plaque. Dans un second temps, une approche mécanistique (études 2 et 3) est utilisée dans le but de fournir des informations complémentaires sur les mécanismes physiopathologiques de l'inflammation impliqués dans l'athérosclérose. L'ensemble de ces études a été réalisé chez le patient à risque d'AVC traité chirurgicalement.

- ETUDE 1 : L'objectif de cette première étude était d'évaluer de manière indépendante les effets de la sédentarité et de l'activité physique sur les paramètres histologiques d'instabilité de la plaque dans une cohorte de 90 patients asymptomatiques à risque d'AVC traités chirurgicalement. Pour cela, nous avons évalué les niveaux de sédentarité et d'activité physique des patients à l'aide des Sedentary Behavior Questionnaire et Global Physical Activity Questionnaire et évalué la composition histologique de leurs plaques. Le but de cette étude de cohorte était de déterminer à la fois si la sédentarité accentuait l'occurrence des paramètres histologiques d'instabilité et si l'activité physique la diminuait. Des marqueurs, utilisés quotidiennement en clinique, de l'hémorragie intraplaque (bleu de Perls marquant le fer libéré par des globules rouges hémolysés), de la néovascularisation (CD34 marquant les cellules endothéliales présentes à la surface des néovaisseaux) et de l'accumulation de macrophages (CD68 marquant les membranes de macrophages) ont alors été mesurés dans les plaques des 90 patients asymptomatiques par analyse immunohistochimique.
- ETUDE 2 : Dans cette deuxième étude, nous nous sommes focalisés sur l'impact de la réponse inflammatoire dans les processus de rupture de plaque. L'objectif de cette étude était

de caractériser les réponses fonctionnelles de cellules immunitaires périphériques dans une cohorte de patients symptomatiques et asymptomatiques vis-à-vis de l'AVC. Pour cela, nous avons stimulé des cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC) de donneurs sains avec le plasma de patients atteints d'athérosclérose (n = 20) et le plasma de donneurs sains (n = 10). Nous avons ensuite évalué l'activation de voies de signalisation associées à l'inflammation dans 10 populations de cellules immunitaires majeures, et évalué l'impact de cytokines pro-inflammatoires fortement exprimées dans le plasma de patients sur l'activation des voies de signalisation. Le but de cette étude était de déterminer si le plasma de patients présentait des caractéristiques différentes du plasma de donneurs sains, favorisant la dysfonction du système immunitaire observée dans le contexte de l'athérosclérose. A l'aide d'un cytomètre de flux dernière génération, nous avons analysé l'expression intracellulaire de 10 phosphoprotéines (IkBa, pCREB, pERK1/2, pMAPKAP2, pp38, pPLCg2, pS6, pSTAT1, pSTAT3, and pSTAT5) dans 10 populations de cellules immunitaires majeures (lymphocytes B, basophiles, CD1cDCs, lymphocytes T CD4, lymphocytes T CD8, monocytes CD14 et CD16, NK, NKT, pDCs). Ensuite, nous avons mesuré l'expression de différentes cytokines dans le plasma de patients dont CCL5, CXCL1, CXCL10, PDGF-AA et PDGF-BB afin de déterminer leurs effets sur la phosphorylation des protéines identifiées préalablement.

- ETUDE 3 : Pour cette troisième étude, nous nous sommes basés sur le protocole et les résultats de l'étude précédente qui nous sert ainsi de base de travail. En effet, l'étude 2 nous a permis de définir l'impact de la réponse inflammatoire dans le processus de rupture dans le contexte général de l'athérosclérose en analysant la différence entre patients et donneurs sains. L'objectif de cette troisième étude était alors de caractériser les réponses fonctionnelles de cellules immunitaires périphériques dans une cohorte de patients asymptomatiques en fonction de leurs niveaux d'activité physique et de sédentarité. Pour cela, nous avons stimulé des PBMC de donneurs sains avec le plasma de patients à la fois les plus actifs et moins sédentaires de notre cohorte initiale et de patients à la fois les moins actifs et les plus sédentaires. Nous avons

ensuite évalué le phénotype des monocytes circulants et l'impact de cytokines pro-inflammatoires les plus fortement exprimées dans le plasma de ces patients dans le phénotype des monocytes circulants. Le but de cette étude était de déterminer si le plasma de patients actifs (et peu sédentaires) présentait des caractéristiques différentes du plasma de patients sédentaires (et peu actifs), favorisant la dysfonction du système immunitaire observée dans le contexte de l'athérosclérose. Une analyse de l'expression extracellulaire de biomarqueurs de monocytes (CD14 et CD16) a été réalisé par cytométrie en flux ainsi qu'une analyse de l'expression de cytokines plasmatiques par multiplex.

- ETUDE 4 : Cette dernière étude est une étude de cohorte qui avait pour objectif d'évaluer l'association entre des paramètres hémorhéologiques et l'athérosclérose. Ainsi, nous avons évalué les niveaux d'activité physique des patients à risque d'AVC (symptomatiques et asymptomatiques) à l'aide du Global Physical Activity Questionnaire et évaluer leurs profils hémorhéologiques. Le but de cette étude complémentaire était de déterminer si l'activité physique était associée à une altération des paramètres hémorhéologiques. Des mesures de viscosité sanguine (à l'aide d'un viscosimètre cône/plan), de déformabilité et d'agrégation érythrocytaire (par syllectométrie) ont été réalisé pour les échantillons sanguins de l'ensemble des 80 patients à risque d'AVC.

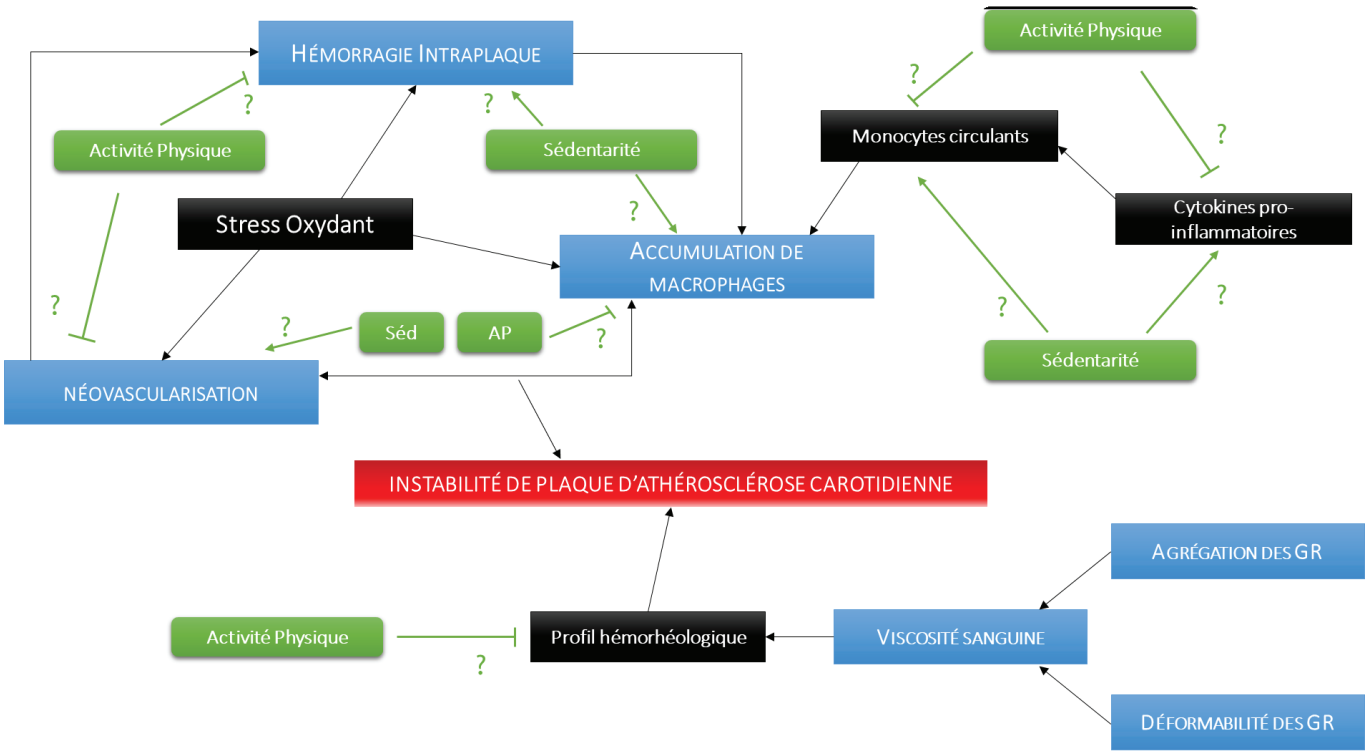


Figure 30. ***Potentiels effets de l'activité physique et de la sédentarité sur les paramètres physiopathologiques de l'instabilité de plaque d'athérosclérose carotidienne***

ÉTUDE 1 : L'ACTIVITE PHYSIQUE REGULIERE REDUIT LA PREVALENCE DE L'HEMORRAGIE INTRAPLAQUE DE PLAQUE D'ATHEROSCLEROSE CAROTIDIENNE ASYMPTOMATIQUE

Mury P, Mura M, Della Schiava N, Chanon S, Vieille-Marchiset A, Nicaise V, Chirico EN, Collet-Benzaquen D, Lermusiaux P, Connes P, Millon A, Pialoux V.

Soumis dans *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (2018)

Au cours des 20 dernières années, le principal traitement de l'athérosclérose carotidienne est la chirurgie d'endartériectomie (en particulier en France), qui consiste en l'ablation de la plaque d'athérome pour prévenir la survenue d'accident vasculaire cérébral. La décision de pratiquer ou non la chirurgie chez des patients asymptomatiques est basée principalement sur le pourcentage de sténose. Néanmoins, il apparait que certaines chirurgies sont inadéquates quant au ratio bénéfice/risque, particulièrement chez des patients asymptomatiques présentant une sténose serrée mais une plaque d'athérome peu vulnérable (à risque embolique et d'AVC faibles). A l'inverse, la pratique de la chirurgie pourrait être appropriée chez des patients asymptomatiques présentant une sténose moindre mais dont la vulnérabilité de la plaque pourrait être importante. Cependant, cette catégorie de patients n'est, à l'heure actuelle, pas opérée voire pas détectée. Il semble donc primordial d'améliorer les biomarqueurs de facteurs d'instabilité afin d'améliorer l'identification des bénéficiaires de chirurgie d'endartériectomie.

Une étude récemment réalisée au sein de notre laboratoire s'est intéressée aux effets de l'activité physique sur le stress oxydant et l'inflammation cérébrale de souris ApoE$^{-/-}$, modèle murin d'athérosclérose le plus fréquemment utilisé (Chirico et al. 2016). Il a notamment été montré que la pratique d'une activité physique améliorait la survie de souris malades et âgées, et qu'elle permettait une diminution de la taille de la plaque. Ce constat de réduction de la taille de plaque a également été fait chez l'homme (Lakka et al. 2001). De plus, une étude de cohorte de très grande ampleur a récemment montré que la pratique d'une activité physique modérée entrainait une réduction de 20% du risque de développement d'une sténose artérielle (Stein et al. 2015). Ces études ne précisent cependant pas sur quels paramètres l'activité physique avait un effet bénéfique. Or, comme nous l'avons vu dans le chapitre 5 de ce manuscrit, l'activité physique exerce des effets bénéfiques sur certains paramètres physiopathologiques impliqués dans l'athérosclérose (stress oxydant, inflammation) ainsi que sur des biomarqueurs de l'athérosclérose précoce (cIMT, volume de plaque, accumulation de LDL, …). Comme précisé dans le chapitre 2 de ce manuscrit, les principaux facteurs d'instabilité de la plaque

d'athérosclérose carotidienne sont l'hémorragie intraplaque, l'accumulation de macrophages et la néovascularisation. Ainsi, il nous a paru intéressant d'évaluer les effets de l'activité physique et de la sédentarité sur les facteurs histologiques d'instabilité de la plaque carotidienne, dans un premier temps et sur les paramètres biologiques dans un second temps.

L'hypothèse principale de ce travail était qu'un comportement sédentaire pouvait augmenter la prévalence des trois principaux facteurs histologiques d'instabilité et des paramètres biologiques tandis que l'activité physique pouvait réduire cette prévalence. Ainsi, nous avons effectué des marquages immunohistochimiques de l'ensemble des plaques : au bleu de Perls pour l'hémorragie intraplaque, au CD34 pour la néovascularisation et au CD68 pour l'accumulation de macrophages. Notre choix s'est tourné vers ces trois marqueurs généraux puisqu'ils sont utilisés en routine pour les analyses anatomo-pathologiques de plaques carotidiennes. Pour les mêmes raisons, nous avons réalisé une analyse semi-quantitative en 3 niveaux afin de se rapprocher au maximum de l'analyse clinique anatomopathologique. Enfin, nous avons réalisé des dosages plasmatiques de stress oxydant, à l'aide d'un marqueur de peroxydation lipidique (MDA), d'un marqueur d'oxydation des protéines (AOPP), et de trois enzymes antioxydantes (catalase, GPx et SOD), présentés dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

Les principaux résultats de cette étude montrent une augmentation de la prévalence de plaques non-hémorragiques dans le tertile de patients les plus actifs de notre cohorte. Ce résultat a été amplifié dans un sous-groupe des patients à la fois les plus actifs et les moins sédentaires, suggérant des effets cumulés de l'activité physique et d'un faible niveau de sédentarité. De plus, nous avons pu identifier le seuil d'activité physique de 900 MET-min/semaine, permettant d'observer l'augmentation de la prévalence de plaques non-hémorragiques. A l'inverse, la prévalence de plaques non-hémorragiques tend à diminuer chez les patients les plus sédentaires. Enfin, une analyse d'odd-ratio nous a permis de montrer que l'AP était le seul facteur protecteur parmi l'ensemble des facteurs de risque d'IPH (co-morbidités, facteurs d'instabilité de plaque et traitements pharmaceutiques). Les résultats de cette étude suggèrent que l'activité

physique pourrait limiter l'occurrence de l'hémorragie intraplaque, qui est reconnue comme étant le principal facteur de risque favorisant l'instabilité de la plaque. Ces résultats soulignent l'importance d'évaluer les niveaux d'activité physique et de sédentarité chez des patients asymptomatiques à risque d'AVC, et de les encourager à simultanément élever leurs niveaux d'activité physique et réduire leurs niveaux de sédentarité. Bien que notre mesure de l'activité physique soit relativement subjective, l'utilisation de questionnaire tel que le GPAQ représente un outil clinique intéressant permettant une analyse simple, rapide et peu coûteuse de l'activité physique. Ainsi, les données issues de ces questionnaires peuvent fournir de précieuses informations complémentaires aux cliniciens lors des consultations afin de mieux conseiller les patients quant aux changements d'habitudes de vie et d'activité physique à réaliser, en vue d'améliorer la prévention primaire.

D'un point de vue plus mécanistique, la présence d'hémorragie intraplaque peut être expliquée à la fois par la présence de néovascularisation, et d'infiltration macrophagique importante. Néanmoins, nous n'avons pas observé d'effets significatifs de l'activité physique et de la sédentarité sur l'occurrence de la néovascularisation. Concernant l'accumulation de macrophages, bien que les résultats ne soient pas significatifs, nous observons une différence de pourcentages inter-tertiles intéressante : nous observons une diminution de la fréquence de plaques avec une importante accumulation de macrophages de 22% chez les patients les moins actifs à 9% chez les patients les plus actifs. Cette diminution est également exacerbée dans l'analyse de sous-groupes avec une fréquence de 31% chez les patients à la fois les moins actifs et les plus sédentaires, et une fréquence de 8% chez les patients les plus actifs et les moins sédentaires. Ces résultats, pas exploitables en tant que tels dans cette cohorte, laissent tout de même penser que l'activité physique et/ou la sédentarité peuvent avoir un impact sur les paramètres inflammatoires de la plaque d'athérosclérose carotidienne.

Des études complémentaires sont alors nécessaires pour confirmer dans cette population spécifique les effets de l'activité physique sur l'hémorragie intraplaque et l'accumulation de

macrophages, notamment par l'intermédiaire de mesure plus objectives (cardiorespiratoires, niveau de condition physique), et suite à une intervention adaptée en activité physique.

Title: Effects of physical activity and sedentary behavior on intraplaque hemorrhage of asymptomatic carotid atherosclerotic plaque

Pauline Mury[1,2] MSc, Mathilde Mura[1,2], Nellie Della Schiava[3] MD, Stéphanie Chanon[4], Aurélie Vieille-Marchiset[4], Virginie Nicaise[5] PhD, Erica N. Chirico[6] PhD, Diane Collet-Benzaquen[7] MD, Patrick Lermusiaux[3] MD PhD, Philippe Connes[1,2,8] PhD, Antoine Millon[3,9*] MD PhD, Vincent Pialoux[1,2,8*] PhD

[*]These authors equally supervised this work.

Affiliations:

[1]Interuniversity Laboratory of Human Movement Biology EA7424, Vascular biology and Red Blood Cell team, University Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France
[2]Laboratory of Excellence GR-Ex, Paris, France
[3]Department of Vascular Surgery, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France
[4]CarMeN Laboratory, INSERM U1060, INRA 1397, University Claude Bernard Lyon 1, Pierre Bénite, France.
[5]Laboratory of Vulnerabilities and Innovation in Sport EA7428, University Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France
[6]Department of Biomedical Sciences, Cooper Medical School of Rowan University, Camden, NJ, USA.
[7]Department of Pathology, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France
[8]Institut Universitaire de France, Paris, France
[9]CarMeN Laboratory, INSERM U1060, University Claude Bernard Lyon 1, Bron, France.

Running title: Physical activity on intraplaque hemorrhage

Address for correspondence:
Vincent Pialoux
Interuniversity Laboratory of Human Movement Science (LIBM EA7424)
Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon,
Campus La Doua, Bat Raphael Dubois,
27-29 bd du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex, France
Tel: +33 4 72 43 16 25
e-mail: vincent.pialoux@univ-lyon1.fr

Keywords: carotid atherosclerosis, intraplaque hemorrhage, physical activity, sedentary behavior

Subject codes: cardiovascular disease, exercise, lifestyle, primary prevention, risk factors, atherosclerosis

Total word count: 6745

Number of figures and tables: 5

TOC category: clinical and population studies

TOC subcategories: arteriosclerosis, vascular biology

Abstract

Objective: Carotid atherosclerotic plaque instability is primarily increased by intraplaque hemorrhage, neovascularization, macrophage accumulation, large lipid core development, and thinning of fibrous cap. Regular physical activity was shown to reduce atherosclerosis progression while sedentary behavior represents a major risk factor of atherosclerosis. The aim of this study was to evaluate the effects of both physical activity and sedentary behavior on the carotid plaque histological characteristics in asymptomatic patients undergoing carotid endarterectomy.

Approach and Results: Intraplaque hemorrhage, neovascularization, macrophage infiltration, lipid core area, and fibrous cap state of carotid plaques from ninety asymptomatic patients were assessed by histological analyses. Physical activity (PA) and sedentary behavior (SB) were determined by questionnaires and the population was divided into tertiles according to physical activity (T1PA<T2PA<T3PA) and sedentary behavior level (T1SB<T2SB<T3SB). In addition, the frequency of the carotid plaque attributes was also classified according to 4 physical activity intensities (600, 900, 1600 and 3000MET-min/week). Prevalence of non-hemorrhagic plaques was higher in T3PA (52%) *vs.* T1PA (26%) and in T1SB (50%) *vs.* T3SB (29%). Moreover, frequency of hemorrhagic plaques was decreased when exercising 900 MET-min/week. All the other attributes of plaque instability were not significantly different between physical activity and sedentary behavior tertiles.

Conclusions: Our results suggest that physical activity and sedentary behavior are associated with intraplaque hemorrhage in carotid plaques of asymptomatic patients. These results highlight the importance of meeting a minimal physical activity threshold and decreasing sedentary behavior as a primary prevention strategy in asymptomatic patients.

Abbreviations

AHA: American Heart Association
BMI: Body Mass Index
CEA: Carotid endarterectomy
GPAQ: Global Physical Activity Questionnaire
HDL-C: high-density lipoprotein-cholesterol
IPH: Intraplaque hemorrhage
LDL-C: low-density lipoprotein-cholesterol
MET: Metabolic equivalent of task
PA: Physical activity
SB: Sedentary behavior
WHO: World Health Organization

Introduction

Atherosclerosis is the leading cause of mortality and morbidity in developed countries, and it will likely become the leading cause of death worldwide in the near future [1]. It is a complex cardiovascular disease exacerbated by several risk factors such as arterial hypertension, obesity, smoking, dyslipidemia, and physical inactivity [2]. Over the last 20 years, the main treatment for patients with carotid atherosclerosis is carotid endarterectomy surgery (CEA), the benefit of which increases with the percentage of stenosis [3]. Nevertheless, in regards to the risk-benefit ratio, CEA could be inadequate for some patients even with high percentage of stenosis [4]. CEA may be more appropriate than a pharmacological medical treatment [3] in the case of high risk plaque instability even if stenosis percentage is lower. The concept of vulnerable plaque has recently emerged [5] with almost 60% of carotid artery-related cardiovascular events being caused by vulnerable plaque rupture due to plaque instability [6]. In this context, Lovett et al characterized the attributes of plaque instability by the presence of a thin or ruptured fibrous cap, a large lipid core, intraplaque hemorrhage (IPH), neovascularization, and macrophage infiltration [7]. Among these attributes, IPH represents the major determining factor of plaque instability [8].

Physical activity (PA) is known to have beneficial effects on atherosclerosis, in particular in limiting the occurrence of coronary heart disease [9] and reducing the incidence of peripheral and carotid artery diseases [10]. Inversely, physical inactivity (i.e. low level of PA) has been shown to predict atherosclerotic disease in a 16-year follow-up study [11] and to be a major potential risk factor for cardiovascular disease mortality. In addition, sedentary behavior (SB) was shown to be associated with higher incidences of cardiovascular disease [12]. In this context, it is important to differentiate the effect of physical inactivity and SB which have been shown to have independent effects on cardiometabolic health [13,14]. Physical inactivity represents the inability to meet the World Health Organization (WHO) recommendations [15] (i.e. practicing at least

150min/week of moderate PA) while SB refers to a lack of walking along with an accumulation of sitting and lying time [16].

It has been demonstrated that PA level negatively correlates with several markers of atherosclerosis such as carotid intima-media thickness, carotid plaque height [17], arterial stiffness [18], and coronary artery calcification [19]. Although cross-sectional studies observed differences in these biomarkers between sedentary and trained subjects [17], they are not suitable for the evaluation of plaque progression and the risk of plaque instability [20]. To our knowledge, there is no study focusing on the effects of PA and SB on the attributes of plaque instability.

The aim of the present study was therefore to evaluate the effects of both SB and PA on histological parameters of carotid plaque instability in asymptomatic patients who underwent endarterectomy surgery. We hypothesized that SB could increase the prevalence of the main histological risk factors of carotid plaque instability whereas PA could reduce this prevalence.

Material and methods

Patients

Ninety asymptomatic patients (i.e. with no clinical history of stroke or transient ischemic attack within the past 6 months) undergoing CEA were included in this study. All patients were being treated with statins, platelet antiaggregants, and angiotensin converting enzyme inhibitors [21]. Written informed consent for the analysis of biological samples and questionnaires were obtained from all patients. This study was approved by the “Hospices Civils de Lyon — CPP Est”. The main cardiovascular risk factors, including hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, smoking status, and body mass index (BMI), were recorded.

Human samples

Carotid atherosclerotic plaques were extracted by CEA. Venous blood samples were drawn from the cephalic vein in tubes containing ethylenediamine tetraacetic acid before surgery. After surgery, carotid plaques were processed by transverse dissection at the site of maximum plaque diameter, fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin.

Questionnaires

Seventy-five of the 90 patients responded to three questionnaires by phone within a week and at least 48 hours after the surgery. The Mini Mental State Examination [22] questionnaire was used to confirm their mental health after the surgery. When the result was adequate (i.e. score > 27) [23], PA and intensity level were measured according to the Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ) and analyzed per the Analysis Guide provided by the WHO. SB time was measured with the Sedentary Behavior Questionnaire [24]. PA time was expressed in min/day, sedentary time was expressed in hours/day, and PA intensity was expressed in MET (metabolic equivalent of task)-min/week.

Biological parameters

Total cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol concentrations were determined using a biochemistry automat analyzer (Abbott architect, Abbott Diagnostics, CA, USA). Platelet count was determined using a hematology analyzer (Coulter LH 750, Beckman Coulter, CA, USA). Plasma fibrinogen was measured by the Clauss method using an ACL Top automatizer (Werfen, Barcelona, Spain). The Clauss method determines a thrombin time based on optical detection of fibrin formation against a standard curve from referent plasma.

Histological staining

No decalcification was performed. Paraffin blocks were transversely dissected to obtain 15 adjacent 5µm sections of carotid plaques. All slices were deparaffinized and stained with

Masson's trichrome for collagen, Perls' blue for iron, CD34 for endothelial cells, and CD68 for macrophages. Three adjacent slices were analyzed per patient and per staining. All slices were scanned using the Axio Scan Z1 slide scanner (Zeiss) and analyzed using the ZEN Lite software for signal quantification (Zeiss). Two researchers experienced in vascular pathology and atherosclerotic plaque attributes quantification blindly quantified all the histology sections (Figure 1). Lipid core area, fibrous cap state, IPH, neovascularization, and macrophage infiltration were graded using a 3-grade scale (for lipid core area and macrophage infiltration: small 0-30%, moderate 30-50% and important >50%; for IPH and neovascularization: no 0%, small 0-30% and important: >30%; for fibrous cap state: thick, thin, or ruptured). Plaques were also classified according to the American Heart Association (AHA) classification [25] and according to the Lovett and Redgrave classification [7].

Statistical analysis

Biological results are expressed as mean ± SD, and categorical data are presented as the frequency of occurrence in each group. All the PA and SB level data were ranked in increasing order. The total population of 75 patients was divided into 3 tertiles (n=25 per tertile) of PA (T1PA, T2PA and T3PA) and SB (T1SB, T2SB and T3SB). T1PA corresponded to the least physically active patients and T3PA to the most physically active patients. T1SB corresponded to the least sedentary and T3SB to the most sedentary. The occurrence of different grades for plaque instability attributes (lipid core area, IPH, neovascularization, macrophage infiltration, and fibrous cap state) was compared among these three groups using a chi-squared test.

Comparisons were also made between patients belonging to both T1PA and T3SB, and patients belonging to both T3PA and T1SB. The occurrence of different grades for plaque instability attributes was compared among these two subgroups using a chi-squared test. Moreover, the

occurrence of different grades for plaque instability attributes was tested for 4 thresholds of PA intensity (>600, >900, >1600 and >3000MET-min/week) using a chi-squared test.

A one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison tests were used to compare the biological parameters between the different PA level and SB level groups. A student t-test was performed when only two groups were compared.

The importance of the associations was estimated by the odds ratio, and the 95% confidence interval (95% CI) was calculated for each odds ratio. Significance level was defined as $p < 0.05$. Analyses were conducted using GraphPad Prism software (v. 5, San Diego, CA, USA).

Results

PA and SB levels

The cohort was divided into 3 PA tertiles (mean values of 3.23 ± 3.6 mins of PA/day, 26.7 ± 9.7 mins of PA/day and 117.1 ± 79.6 mins of PA/day for T1PA, T2PA and T3PA, respectively) and 3 SB tertiles (mean values of 4.72 ± 1.1 hours of SB/day, 7.4 ± 0.8 hours of SB/day and 10.9 ± 2.2 hours of SB/day for T1SB, T2SB and T3SB, respectively). We also divided the cohort according to mixed criteria: patients with both the lowest PA level and the highest SB level (n=13; T1PA/T3SB: 3.42 ± 4.34 min/day and 10.99 ± 2.13 h/day for PA and SB, respectively) and patients with both the highest PA level and the lowest SB level (n=13; T3PA/T1SB: 126.98 ± 106.36 min/day and 4.50 ± 1.24 h/day for PA and SB, respectively).

Cardiovascular risk factors characteristics

Neither age, nor the following biological parameters (total cholesterol, triglycerides, HDL-C, LDL-C, glucose) or the different cardiovascular risk factors (hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, smoking, BMI) differed between the different PA or SB tertiles (Table 1 and 2, respectively). In addition, we found no difference in any of these parameters between the

different MET categories (i.e., <600 *vs.* >600, <900 *vs.* >900, <1600 *vs.* >1600 and <3000 *vs.* >3000; data not shown). Platelet level was significantly lower in T3PA than in T1PA (204.4 ± 44.3 *vs.* 246.0 ± 76.4 10^{-9}/L, respectively; p = 0.033). Fibrinogen level was significantly higher in T3SB than in T1SB (4.01 ± 1.13 *vs.* 3.31 ± 1.06 g/L, respectively; p = 0.036).

PA and SB level affect the prevalence of IPH

To analyze the frequency of vulnerable plaque attributes, we evaluated the presence of plaque instability attributes in asymptomatic carotid plaques of the whole cohort using a 3-grade scale. We observed a significant lower frequency ($p < 0.05$, $\chi^2 = 3.67$) of non-hemorrhagic plaques in T1PA (26%) compared to T3PA (52%) (Figure 2A). On the contrary, we did not find any significant differences among PA tertiles regarding neovascularization, macrophage infiltration, lipid core area, fibrous cap state (Figure S1) and the Lovett and AHA classifications (Table 1).

We observed a higher frequency ($p = 0.08$, $\chi^2 = 4.87$) of non-hemorrhagic plaques in the T1SB (50%) compared to T3SB (29%) (Figure 2B). On the contrary, no significant differences among SB tertiles were found for neovascularization, macrophage infiltration, lipid core area, fibrous cap state (Figure S2) and the Lovett and AHA classifications (Table 2).

We found a lower frequency ($p < 0.05$, $\chi^2 = 5.49$) of non-hemorrhagic plaques (Figure 2C) in the T1PA/T3SB group (31%) compared to the T3PA/T1SB group (69%). However, no significant differences were found for neovascularization, macrophage infiltration, lipid core area, fibrous cap state, and the Lovett and AHA classifications.

We found an increase in the frequency of non-hemorrhagic plaques for patients with PA intensity over the 900 MET-min/week threshold (Figure 2D).

To identify predictors of IPH, we calculated odds ratio for all risk factors and pharmacological treatments. We observed that diabetes mellitus (OR 3.80, 95% CI 1.39 to 10.40), thin or ruptured fibrous cap (OR 2.87, 95% CI 0.98 to 8.38), and platelet antiaggregant treatment (OR 7.50, 95%

CI 1.93 to 29.19) were positively associated to presence of IPH while high level of daily physical activity (OR 0.31, 95% CI 0.09 to 1.05) was negatively associated to presence of IPH (Figure 3). The positive association between IPH and fibrous cap state was also observed from chi-squared analysis ($p = 0.0475$, $\chi^2 = 9.61$) (Figure S3).

Discussion

The results of the present study mainly demonstrated that higher levels of daily PA and lower levels of SB are associated to lower prevalence of IPH in asymptomatic patients at high-risk of stroke who underwent endarterectomy surgery.

During the last two decades, epidemiological studies underlined the positive effect of leisure-time PA on the progression of carotid atherosclerosis [10,17,26]. These studies focused on carotid intima-media thickness, plaque volume, coronary artery calcification or arterial stiffness which do not reflect the risk of plaque instability. Recently, Stein et al. reported a strong inverse association between any PA and lower carotid artery stenosis prevalence in a 3 million subject cohort cross-sectional design study [10], which confirms previous findings from Lakka et al. obtained during a follow-up of 4 years of 854 middle-aged men [17]. However, to the best of our knowledge, this is the first time that association between daily PA and SB with plaque instability attributes is investigated in asymptomatic patients at high-risk of stroke. Our results provide evidence that PA could minimize IPH in asymptomatic carotid plaques. Interestingly, in a subgroup analysis, we found that differences in hemorrhagic plaques frequency between patients presenting both lowest level of PA and highest level of SB (T1PA/T3SB) and patients presenting both highest level of PA and lowest level of SB (T3PA/T1SB) (Figure 2C) were even more important (69 *vs.* 31%) suggesting a cumulative effect of SB and low levels of PA on IPH. This result could be explained by an independent effect of physical inactivity and SB on cardiovascular health [13,14]. Physical inactivity represents an inability to meet the WHO

recommendations [15] while SB is the lack of walking and accumulation of sitting and lying time [16]. Interestingly, from odds ratio analysis, we found that PA significantly decreases risk of IPH (Figure 3). Among all tested risk factors (comorbidities, factors of plaque instability, pharmacological treatments), PA is the only protective factor for IPH (Figure 3). From a clinical perspective, these findings are particularly important in terms of primary prevention. Indeed, our results suggest that decreasing SB additionally to increasing PA could be of major interest for asymptomatic patients with important carotid stenosis but apparent lower instability and, thus, not eligible for CEA (i.e. with an unfavorable benefit/risk ratio of the CEA).

Minimal levels of PA leading to reduction of IPH

Previous epidemiological studies reported a dose-response relationship between PA and the risk of cardiovascular disease and mortality [27–29]. PA of moderate intensity includes domestic PA such as scrubbing floors, cleaning windows or gardening, walking and leisure-time PA corresponds to cycling, swimming or running performed at a moderate intensity. Moreover, several studies reported inverse relationships between daily PA (reported by the GPAQ) and cardiovascular risk factors [30] and stroke prevalence [31]. Current PA recommendations established by the WHO prescribe to practice at least 600MET-min/week (or 150min of moderate PA per week) to prevent cardiovascular mortality in older adults [32]. Accordingly, in 2010, performing less than the recommended amount of PA by the WHO (<600MET-min/week) was responsible for 31% of ischemic heart disease, representing 3.2 million deaths worldwide [33]. Nevertheless, these recommendations have been challenged by several authors who qualified the amount of 600MET-min/week as a non-optimal PA level to prevent cardiovascular diseases, and more particularly ischemic stroke and ischemic heart disease [34,35]. A recent study suggested that morbidity associated with coronary artery disease was reduced over 900MET-min/week in a 64 years olds [36]. Poggio et al. showed that a level of PA under 1600MET-min/week contributed to

29% of ischemic heart disease deaths and 21% of stroke deaths in a cohort of 24,427 subjects in Argentina [37]. In addition, a recent meta-analysis examining the dose-response relationships between total PA and the risk of major diseases, including ischemic stroke events, showed that high levels of total PA was associated with a lower risk of disease but the major gain occurred at 3000-4000MET-min/week for all disease states and most prominently for ischemic heart disease [38]. Our results showed that the minimum threshold of 900MET-min/week (equivalent to 45min per day of moderate PA *vs.* 30min for WHO recommendation) could decrease carotid IPH in asymptomatic patients (Figure 2D) and may be promoted by physicians to patients for cardiovascular diseases prevention.

The GPAQ is a standardized and validated questionnaire [39]. In the context of carotid plaque medical care, it may represent a valuable clinical tool to measure PA and SB. According to our results, this questionnaire is able to discriminate the effects of PA and SB on the occurrence of IPH among a population of asymptomatic patients with large stenosis. Although, PA and SB questionnaires may overestimate energy expenditures, the minimal thresholds corresponding to a decrease of cardiovascular risks we used in this present study (i.e. 600, 900, 1600, 3000 MET-min/week) have been determined in large cohort of subjects using questionnaires including GPAQ [32,36–38]. From a clinical perspective, the use of such questionnaires is simple, quick, and inexpensive, and could help surgical decision making and to better advise lifestyle changes for the patient.

Biological mechanisms of IPH decrease

IPH represents the major determining factor of plaque instability [8] and is associated with future ischemic events [40]. Our results support the fact that IPH occurrence could be attenuated by daily PA, particularly when exceeding 900MET-min/week (Figure 2 and 3). Moreover, we found that presence of diabetes mellitus could exacerbate occurrence of IPH, confirming previous findings [41] such as platelet antiaggregant treatment [42] while no other risk factor is significantly associated

to IPH occurrence (Figure 3). Neovascularization could be involved in plaque rupture [43] by its potential participation in IPH development [44] due to neovessels immaturity and fragility [45]. Macrophage accumulation has been also reported in vulnerable and symptomatic plaques but not in stable ones [46]. The beneficial effect of PA on inflammation was also well demonstrated in healthy population [47] and stroke patients [48] whereas SB was shown to increase inflammation [49]. This could be in agreement with the lower fibrinogen and platelet concentration found in the most active patients (T3PA). Nevertheless, even in the least active group (T1PA), the fibrinogen and platelets values remain in the normal range. Unfortunately, we failed to find differences in neovascularization and macrophage infiltration in regards to PA and SB in this patient cohort. One could suggest that the intensity and/or kinetic of the underlying biological mechanisms explaining the protective effect of PA and SB limitation on IPH could be different than those leading to lower neovascularization and macrophage infiltration in the plaque [50]. It could be also argued that both neovascularization and macrophage accumulation are not sensitive enough to the effect of PA when analyzed individually, as is with IPH. Indeed, although not significant, the frequency of plaques with important macrophage infiltration was 9% in T3PA vs. 22% in T1PA (Figure S1). Inversely, we found a positive association between IPH and thin or ruptured fibrous cap (Figure 3 and S3) suggesting that IPH is likely the major determining factor of plaque rupture, confirming thus previous finding in the literature [8].

In conclusion, asymptomatic carotid atherosclerosis patients reporting the highest level of daily PA had the lowest frequencies of IPH, especially when PA exceeded 900MET-min/week. These findings were enhanced in subgroups of patients with both the lowest level of SB and highest of PA, suggesting cumulative effects of PA and low level of SB. These findings were strengthened by an odds ratio analysis of risk factors of IPH showing that PA was the only protective factor for IPH. The results of this study highlight the importance in evaluating PA and SB levels in asymptomatic patients not eligible for CEA and to encourage them to concomitantly increase

their PA and reduce their SB. Further investigations are needed to confirm in this population the effect of PA intervention on IPH.

Acknowledgments: We thank the operating room staff of the vascular surgery department of Edouard Herriot Hospital of Lyon and the histology imaging core staff of Anipath, Ciqle of Lyon for technical support. SC is supported by a Sinergia Swiss National Fundation grant (FNS).

Sources of Funding: This study was funded by the *Institut Universitaire de France*.

Disclosures: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P, American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135(10):e146-e603. doi:10.1161/CIR.0000000000000485.

2. Helgason CM, Wolf PA. American Heart Association Prevention Conference IV: Prevention and Rehabilitation of Stroke: Executive Summary. *Circulation*. 1997;96(2):701-707. doi:10.1161/01.CIR.96.2.701.

3. Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Fox AJ, Taylor DW, Mayberg MR, Warlow CP, Barnett HJM, Carotid Endarterectomy Trialists' Collaboration. Analysis of pooled data from the randomised controlled trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Lancet Lond Engl*. 2003;361(9352):107-116.

4. Barnett HJM, Meldrum HE, Eliasziw M, North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) collaborators. The appropriate use of carotid endarterectomy. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can*. 2002;166(9):1169-1179.

5. Fayad ZA, Fuster V. Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. *Circ Res*. 2001;89(4):305-316.

6. Redgrave JNE, Lovett JK, Gallagher PJ, Rothwell PM. Histological assessment of 526 symptomatic carotid plaques in relation to the nature and timing of ischemic symptoms: the Oxford plaque study. *Circulation*. 2006;113(19):2320-2328. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.589044.

7. Lovett JK, Gallagher PJ, Hands LJ, Walton J, Rothwell PM. Histological Correlates of Carotid Plaque Surface Morphology on Lumen Contrast Imaging. *Circulation*. 2004;110(15):2190-2197. doi:10.1161/01.CIR.0000144307.82502.32.

8. Michel J-B, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J*. 2011;32(16):1977-1985, 1985a, 1985b, 1985c. doi:10.1093/eurheartj/ehr054.

9. Sofi F, Capalbo A, Cesari F, Abbate R, Gensini GF. Physical activity during leisure time and primary prevention of coronary heart disease: an updated meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2008;15(3):247-257. doi:10.1097/HJR.0b013e3282f232ac.

10. Stein RA, Rockman CB, Guo Y, Adelman MA, Riles T, Hiatt WR, Berger JS. Association Between Physical Activity and Peripheral Artery Disease and Carotid Artery Stenosis in a Self-Referred Population of 3 Million Adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(1):206-212. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304161.

11. Haapanen-Niemi N, Miilunpalo S, Pasanen M, Vuori I, Oja P, Malmberg J. Body mass index, physical inactivity and low level of physical fitness as determinants of all-cause and cardiovascular disease mortality--16 y follow-up of middle-aged and elderly men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*. 2000;24(11):1465-1474.

12. Bankoski A, Harris TB, McClain JJ, Brychta RJ, Caserotti P, Chen KY, Berrigan D, Troiano RP, Koster A. Sedentary activity associated with metabolic syndrome independent of physical activity. *Diabetes Care*. 2011;34(2):497-503. doi:10.2337/dc10-0987.

13. Ford ES, Kohl HW, Mokdad AH, Ajani UA. Sedentary behavior, physical activity, and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Obes Res*. 2005;13(3):608-614. doi:10.1038/oby.2005.65.

14. Gennuso KP, Gangnon RE, Matthews CE, Thraen-Borowski KM, Colbert LH. Sedentary behavior, physical activity, and markers of health in older adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2013;45(8):1493-1500. doi:10.1249/MSS.0b013e318288a1e5.

15. Haskell WL, Lee I-M, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, Macera CA, Heath GW, Thompson PD, Bauman A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39(8):1423-1434. doi:10.1249/mss.0b013e3180616b27.

16. Owen N, Sparling PB, Healy GN, Dunstan DW, Matthews CE. Sedentary behavior: emerging evidence for a new health risk. *Mayo Clin Proc*. 2010;85(12):1138-1141. doi:10.4065/mcp.2010.0444.

17. Lakka TA, Laukkanen JA, Rauramaa R, Salonen R, Lakka HM, Kaplan GA, Salonen JT. Cardiorespiratory fitness and the progression of carotid atherosclerosis in middle-aged men. *Ann Intern Med*. 2001;134(1):12-20.

18. Horta BL, Schaan BD, Bielemann RM, Vianna CÁ, Gigante DP, Barros FC, Ekelund U, Hallal PC. Objectively measured physical activity and sedentary-time are associated with arterial stiffness in Brazilian young adults. *Atherosclerosis*. 2015;243(1):148-154. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.005.

19. Kwaśniewska M, Jegier A, Kostka T, Dziankowska-Zaborszczyk E, Rębowska E, Kozińska J, Drygas W. Long-Term Effect of Different Physical Activity Levels on Subclinical Atherosclerosis in Middle-Aged Men: A 25-Year Prospective Study. *PLoS ONE*. 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0085209.

20. Den Ruijter HM, Peters SAE, Anderson TJ, Britton AR, Dekker JM, Eijkemans MJ, Engström G, Evans GW, de Graaf J, Grobbee DE, Hedblad B, Hofman A, Holewijn S, Ikeda A, Kavousi M, Kitagawa K, Kitamura A, Koffijberg H, Lonn EM, Lorenz MW, Mathiesen EB, Nijpels G, Okazaki S, O'Leary DH, Polak JF, Price JF, Robertson C, Rembold CM, Rosvall M, Rundek T, Salonen JT, Sitzer M, Stehouwer CDA, Witteman JC, Moons KG, Bots ML. Common carotid intima-media thickness measurements in cardiovascular risk prediction: a meta-analysis. *JAMA*. 2012;308(8):796-803. doi:10.1001/jama.2012.9630.

21. Haute Autorité de Santé. *Prévention Vasculaire Après Un Infarctus Cérébral Ou Un Accident Ischémique Transitoire*.; 2015.

22. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975;12(3):189-198.

23. Crum RM, Anthony JC, Bassett SS, Folstein MF. Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and educational level. *JAMA*. 1993;269(18):2386-2391.

24. Rosenberg DE, Norman GJ, Wagner N, Patrick K, Calfas KJ, Sallis JF. Reliability and validity of the Sedentary Behavior Questionnaire (SBQ) for adults. *J Phys Act Health*. 2010;7(6):697-705.

25. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(9):1512-1531.

26. Ried-Larsen M, Grøntved A, Froberg K, Ekelund U, Andersen LB. Physical activity intensity and subclinical atherosclerosis in Danish adolescents: The European Youth Heart Study. *Scand J Med Sci Sports*. 2013;23(3):e168-e177. doi:10.1111/sms.12046.

27. Mora S, Cook N, Buring JE, Ridker PM, Lee I-M. Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms. *Circulation*. 2007;116(19):2110-2118. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.729939.

28. van Dam RM, Li T, Spiegelman D, Franco OH, Hu FB. Combined impact of lifestyle factors on mortality: prospective cohort study in US women. *BMJ*. 2008;337:a1440.

29. Stamatakis E, Hamer M, Lawlor DA. Physical activity, mortality, and cardiovascular disease: is domestic physical activity beneficial? The Scottish Health Survey -- 1995, 1998, and 2003. *Am J Epidemiol*. 2009;169(10):1191-1200. doi:10.1093/aje/kwp042.

30. Dickie K, Micklesfield LK, Chantler S, Lambert EV, Goedecke JH. Meeting physical activity guidelines is associated with reduced risk for cardiovascular disease in black South African women; a 5.5-year follow-up study. *BMC Public Health*. 2014;14:498. doi:10.1186/1471-2458-14-498.

31. Lee CD, Folsom AR, Blair SN. Physical activity and stroke risk: a meta-analysis. *Stroke*. 2003;34(10):2475-2481. doi:10.1161/01.STR.0000091843.02517.9D.

32. World Health Organization. *Global Recommendations on Physical Activity for Health.*; 2010. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305057/. Accessed October 19, 2017.

33. GBD 2013 Risk Factors Collaborators, Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR, Bachman VF, Biryukov S, Brauer M, Burnett R, Casey D, Coates MM, Cohen A, Delwiche K, Estep K, Frostad JJ, Astha KC, Kyu HH, Moradi-Lakeh M, Ng M, Slepak EL, Thomas BA, Wagner J, Aasvang GM, Abbafati C, Abbasoglu Ozgoren A, Abd-Allah F, Abera SF, Aboyans V, Abraham B, Abraham JP, Abubakar I, Abu-Rmeileh NME, Aburto TC, Achoki T, Adelekan A, Adofo K, Adou AK, Adsuar JC, Afshin A, Agardh EE, Al Khabouri MJ, Al Lami FH, Alam SS, Alasfoor D, Albittar MI, Alegretti MA, Aleman AV, Alemu ZA, Alfonso-Cristancho R, Alhabib S, Ali R, Ali MK, Alla F, Allebeck P, Allen PJ, Alsharif U, Alvarez E, Alvis-Guzman N, Amankwaa AA, Amare AT, Ameh EA, Ameli O, Amini H, Ammar W, Anderson BO,

457 Antonio CAT, Anwari P, Argeseanu Cunningham S, Arnlöv J, Arsenijevic VSA,
458 Artaman A, Asghar RJ, Assadi R, Atkins LS, Atkinson C, Avila MA, Awuah B,
459 Badawi A, Bahit MC, Bakfalouni T, Balakrishnan K, Balalla S, Balu RK, Banerjee A,
460 Barber RM, Barker-Collo SL, Barquera S, Barregard L, Barrero LH, Barrientos-
461 Gutierrez T, Basto-Abreu AC, Basu A, Basu S, Basulaiman MO, Batis Ruvalcaba C,
462 Beardsley J, Bedi N, Bekele T, Bell ML, et al. Global, regional, and national
463 comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and
464 metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis
465 for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Lond Engl*.
466 2015;386(10010):2287-2323. doi:10.1016/S0140-6736(15)00128-2.

467 34. Hu FB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Rexrode KM, Willett WC, Manson JE.
468 Physical activity and risk of stroke in women. *JAMA*. 2000;283(22):2961-2967.

469 35. Danaei G, Ding EL, Mozaffarian D, Taylor B, Rehm J, Murray CJL, Ezzati M. The
470 Preventable Causes of Death in the United States: Comparative Risk Assessment of
471 Dietary, Lifestyle, and Metabolic Risk Factors. *PLoS Med*. 2009;6(4).
472 doi:10.1371/journal.pmed.1000058.

473 36. Zhao S, Zhang Z, Long Q, Ma Y, Lian X, Yang Y, Gao W, Chen Z, Wang L.
474 Association between Time of Day of Sports-Related Physical Activity and the Onset of
475 Acute Myocardial Infarction in a Chinese Population. *PLoS ONE*. 2016;11(1).
476 doi:10.1371/journal.pone.0146472.

477 37. Poggio R. Preventable Ischaemic Heart Disease and Stroke Deaths Attributable to
478 Insufficient Physical Activity: A Comparative Risk Assessment Analysis in the
479 Argentinian Population, Preventable Ischaemic Heart Disease and Stroke Deaths
480 Attributable to Insufficient Physical Activity: A Comparative Risk Assessment
481 Analysis in the Argentinian Population.
482 https://clinmedjournals.org/articles/ijsem/international-journal-of-sports-and-exercise-
483 medicine-ijsem-3-056.php?jid=ijsem. Accessed July 12, 2017.

484 38. Kyu HH, Bachman VF, Alexander LT, Mumford JE, Afshin A, Estep K, Veerman JL,
485 Delwiche K, Iannarone ML, Moyer ML, Cercy K, Vos T, Murray CJL, Forouzanfar
486 MH. Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart
487 disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-
488 analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *BMJ*. 2016;354:i3857.
489 doi:10.1136/bmj.i3857.

490 39. Cleland CL, Hunter RF, Kee F, Cupples ME, Sallis JF, Tully MA. Validity of the
491 global physical activity questionnaire (GPAQ) in assessing levels and change in
492 moderate-vigorous physical activity and sedentary behaviour. *BMC Public Health*.
493 2014;14:1255. doi:10.1186/1471-2458-14-1255.

40. Turc G, Oppenheim C, Naggara O, Eker OF, Calvet D, Lacour J-C, Crozier S, Guegan-Massardier E, Hénon H, Neau J-P, Toussaint J-F, Mas J-L, Méder J-F, Touzé E, HIRISC study investigators. Relationships between recent intraplaque hemorrhage and stroke risk factors in patients with carotid stenosis: the HIRISC study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(2):492-499. doi:10.1161/ATVBAHA.111.239335.

41. Purushothaman K-R, Purushothaman M, Muntner P, Lento PA, O'Connor WN, Sharma SK, Fuster V, Moreno PR. Inflammation, neovascularization and intra-plaque hemorrhage are associated with increased reparative collagen content: implication for plaque progression in diabetic atherosclerosis. *Vasc Med Lond Engl*. 2011;16(2):103-108. doi:10.1177/1358863X11402249.

42. Liem MI, Schreuder FHBM, van Dijk AC, de Rotte AAJ, Truijman MTB, Daemen MJAP, van der Steen AFW, Hendrikse J, Nederveen AJ, van der Lugt A, Kooi ME, Nederkoorn PJ. Use of Antiplatelet Agents Is Associated With Intraplaque Hemorrhage on Carotid Magnetic Resonance Imaging: The Plaque at Risk Study. *Stroke*. 2015;46(12):3411-3415. doi:10.1161/STROKEAHA.115.008906.

43. Parma L, Baganha F, Quax PHA, de Vries MR. Plaque angiogenesis and intraplaque hemorrhage in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. April 2017. doi:10.1016/j.ejphar.2017.04.028.

44. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10):2054-2061. doi:10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18.

45. Dunmore BJ, McCarthy MJ, Naylor AR, Brindle NPJ. Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques. *J Vasc Surg*. 2007;45(1):155-159. doi:10.1016/j.jvs.2006.08.072.

46. Butcovan D, Mocanu V, Baran D, Ciurescu D, Tinica G. Assessment of vulnerable and unstable carotid atherosclerotic plaques on endarterectomy specimens. *Exp Ther Med*. 2016;11(5):2028-2032. doi:10.3892/etm.2016.3096.

47. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(9):607-615. doi:10.1038/nri3041.

48. Pinto A, Di Raimondo D, Tuttolomondo A, Buttà C, Milio G, Licata G. Effects of physical exercise on inflammatory markers of atherosclerosis. *Curr Pharm Des*. 2012;18(28):4326-4349.

49. Parsons TJ, Sartini C, Welsh P, Sattar N, Ash S, Lennon LT, Wannamethee SG, Lee I-M, Whincup PH, Jefferis BJ. Physical Activity, Sedentary Behavior, and Inflammatory

and Hemostatic Markers in Men. *Med Sci Sports Exerc*. 2017;49(3):459-465. doi:10.1249/MSS.0000000000001113.

50. Demeure F, Bouzin C, Roelants V, Bol A, Verhelst R, Astarci P, Gerber BL, Pouleur A-C, Pasquet A, de Meester C, Vanoverschelde J-LJ, Vancraeynest D. Head-to-Head Comparison of Inflammation and Neovascularization in Human Carotid Plaques: Implications for the Imaging of Vulnerable Plaques. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10(5). doi:10.1161/CIRCIMAGING.116.005846.

Highlights

- Using histological analysis, this study demonstrated that PA can limit IPH occurrence, which is the major determining factor of plaque instability, while SB may aggravate it.
- The use of PA and SB questionnaires may be considered in asymptomatic patients where CEA is not advised, to quickly evaluate their PA and SB level and to encourage them to increase their energy expenditure.
- Future studies should test the effect of PA intervention in such asymptomatic patients. This methodological approach should use noninvasive vascular imaging modalities for assessment of IPH and other risk factor of carotid plaque instability.

563 Table 1. *Cardiovascular risk factors and biological characteristics of the PA tertiles*

	T1PA	T2PA	T3PA	References
n	25	25	25	
Men/Women	19/6	22/3	20/5	
Age (years)	72.7 ± 9.2	67.8 ± 9.7	71.2 ± 7.7	
Hypertension	18 (72%)	16 (64%)	19 (76%)	
Dyslipidemia	10 (40%)	11 (44%)	8 (32%)	
Diabetes mellitus	8 (32%)	5 (20%)	8 (32%)	
Smoking				
Active	4 (16%)	4 (16%)	2 (8%)	
Weaned	15 (60%)	17 (68%)	15 (60%)	
pack-year	34.2 ± 28.4	38.8 ± 27.1	25.9 ± 19.0	
BMI	26.4 ± 4.4	26.3 ± 4.5	26.6 ± 4.5	
Percent stenosis	66.8 ± 11.2	76.8 ± 8.1*	70.2 ± 8.5	
AHA classification				
Type III	8 (32%)	2 (8%)	5 (20%)	
Type IV	6 (24%)	4 (16%)	6 (24%)	
Type V	4 (16%)	11 (44%)	8 (32%)	
Type VI	7 (28%)	8 (32%)	6 (24%)	
Lovett classification				
Grade 1	2 (8%)	2 (8%)	2 (8%)	
Grade 2	8 (32%)	2 (8%)	8 (32%)	
Grade 3	12 (48%)	17 (68%)	12 (48%)	
Grade 4	3 (12%)	4 (16%)	3 (12%)	
Total cholesterol (mmol/l)	4.85 ± 1.3	5.72 ± 0.75	3.74 ± 0.68	3.5 – 7.0
Triglycerides (mmol/l)	1.75 ± 0.63	1.65 ± 0.34	1.28 ± 0.50	0.4 – 1.7
HDL-C (g/l)	1.23 ± 0.41	1.32 ± 0.51	1.08 ± 0.28	> 1.0
LDL-C (mmol/l)	2.89 ± 1.19	3.66 ± 0.74	2.08 ± 0.56	1.9 – 4.1
Platelets (10^{-9}/l)	246.0 ± 76.4	235.9 ± 51.8	204.4 ± 44.3*	150 - 400
Glucose (mmol/l)	6.44 ± 2.31	6.77 ± 2.75	6.72 ± 2.62	4.1 – 5.8
Fibrinogen (g/l)	3.88 ± 1.2	3.55 ± 0.99	3.35 ± 0.76	2.38 – 4.98

564 Tertiles; T1PA: the less physically active patients, T2PA: the intermediate physically active
565 patients, T3PA: the most physically active patients. Values are expressed as mean ± SD, and
566 percent within the group. AHA, American Heart Association; BMI, body mass index; HDL-C,
567 high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol.

568

569

570

571

572

573 Table 2. *Cardiovascular risk factors and biological characteristics of the SB tertiles*

	T1SB	T2SB	T3SB	References
n	25	24	26	
Men/Women	21/4	21/3	20/6	
Age (years)	71,3 ± 9,2	70,3 ± 9,1	71,6 ± 9,1	
Hypertension	19 (76%)	16 (66,7%)	20 (76,9%)	
Dyslipidemia	9 (36%)	9 (37,5%)	13 (50,0%)	
Diabetes mellitus	5 (20%)	8 (33,3%)	9 (34,6%)	
Smoking				
Active	1 (4%)	5 (20,8%)	8 (30,8%)	
Detoxed	17 (68%)	15 (62,5%)	14 (53,8%)	
pack-year	26,9 ± 21,9	37,3 ± 25,0	37,0 ± 29,1	
BMI	26,6 ± 4,6	26,3 ± 4,5	26,4 ± 4,4	
Percent stenosis	69,0 ± 11,6	73,2 ± 8,5	73,3 ± 9,6	
AHA classification				
Type III	6 (24%)	6 (25%)	4 (15%)	
Type IV	6 (24%)	2 (8%)	9 (35%)	
Type V	6 (24%)	7 (29%)	10 (38%)	
Type VI	7 (28%)	9 (38%)	3 (12%)	
Lovett classification				
Grade 1	3 (12%)	4 (17%)	0 (0%)	
Grade 2	7 (28%)	5 (21%)	8 (31%)	
Grade 3	14 (56%)	13 (54%)	12 (46%)	
Grade 4	1 (4%)	2 (8%)	6 (23%)	
Total cholesterol (mmol/l)	4,59 ± 1,38	5,07 ± 1,51	4,72 ± 1,21	3.5 – 7.0
Triglycerides (mmol/l)	1,36 ± 0,62	1,86 ± 0,09	1,73 ± 0,59	0.4 – 1.7
HDL-C (g/l)	1,36 ± 0,42	1,22 ± 0,10	1,08 ± 0,42	> 1.0
LDL-C (mmol/l)	2,62 ± 1,16	3,00 ± 1,64	2,87 ± 0,93	1.9 – 4.1
Platelets (10^{-9}/l)	227,1 ± 53,5	207,9 ± 47,55	246,4 ± 71,49	150 - 400
Glucose (mmol/l)	6,70 ± 2,66	5,97 ± 2,08	7,01 ± 2,75	4.1 – 5.8
Fibrinogen (g/l)	3,31 ± 1,06	3,43 ± 0,64	4,01 ± 1,13*	2.38 – 4.98

574 Tertiles; T1SB: the less sedentary active patients, T2: the intermediate sedentary active
575 patients, T3: the most sedentary active patients. Values are expressed as mean ± SD, and
576 percent within the group. AHA, American Heart Association; BMI, body mass index; HDL-C,
577 high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol.

578

579

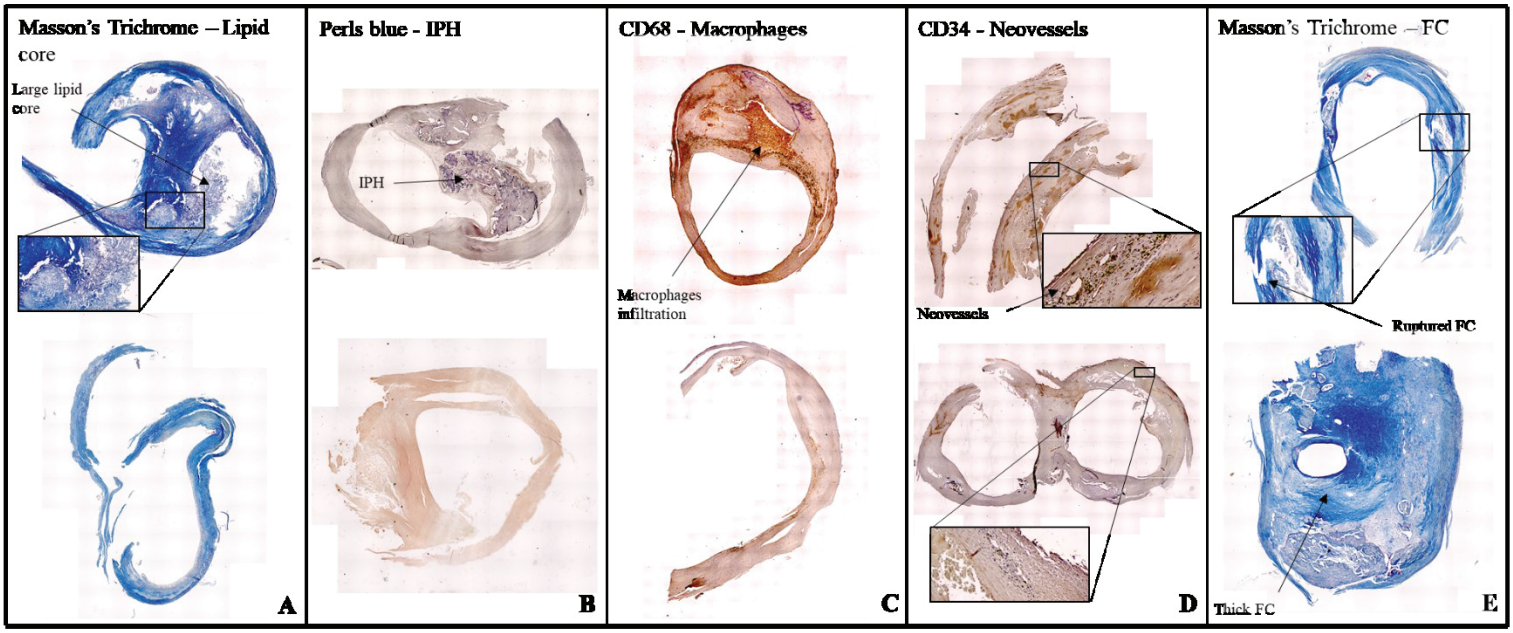
580

581

582

583 **Figures**

584 Figure 1.



585 *Histological evaluation of plaque instability features in asymptomatic carotid atherosclerotic*
586 *plaques.* (A) Lipid core area was evaluated by Masson's Trichrome staining. (B) Intraplaque
587 hemorrhage (IPH) was evaluated by Perls Blue staining. (C) Macrophages infiltration was
588 evaluated by CD68 staining. (D) Neovascularization was evaluated by CD34 staining. (E)
589 Fibrous cap (FC) state was evaluated by Masson's Trichrome staining. Top: plaques with large
590 lipid core, important IPH, important macrophages infiltration, significant neovessels density and
591 ruptured FC. Bottom: plaques with no or small lipid core, no IPH, small macrophages
592 infiltration, low neovessels density and thick FC.

593

594

595

596

597

598

599

600

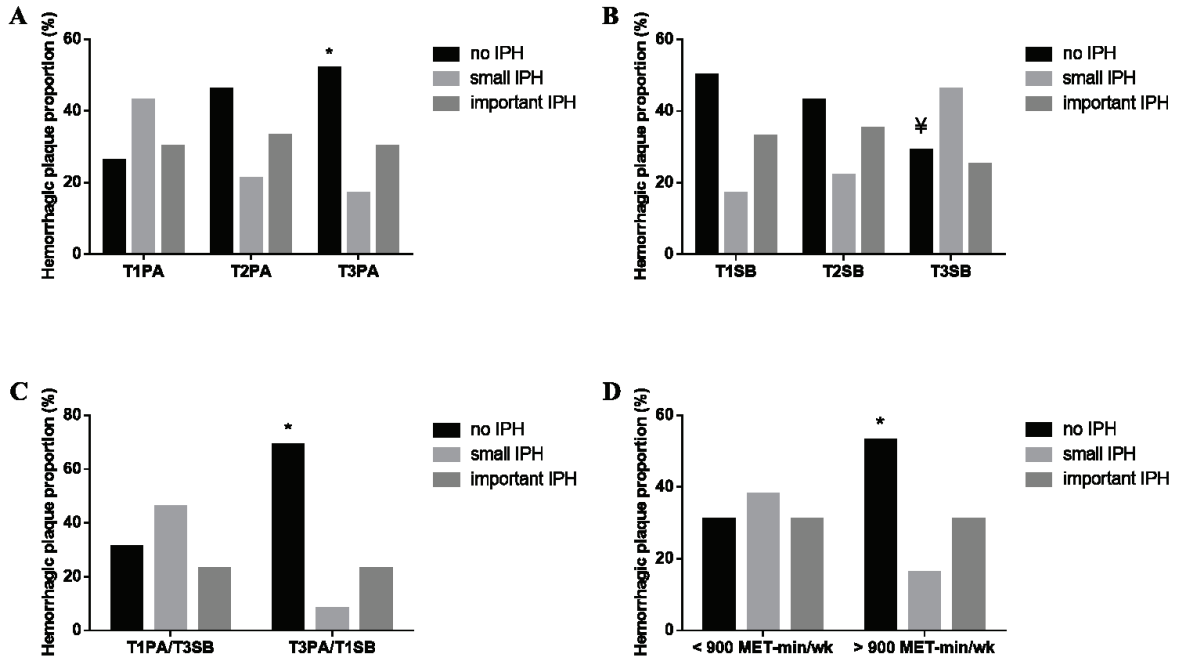
601

602

603

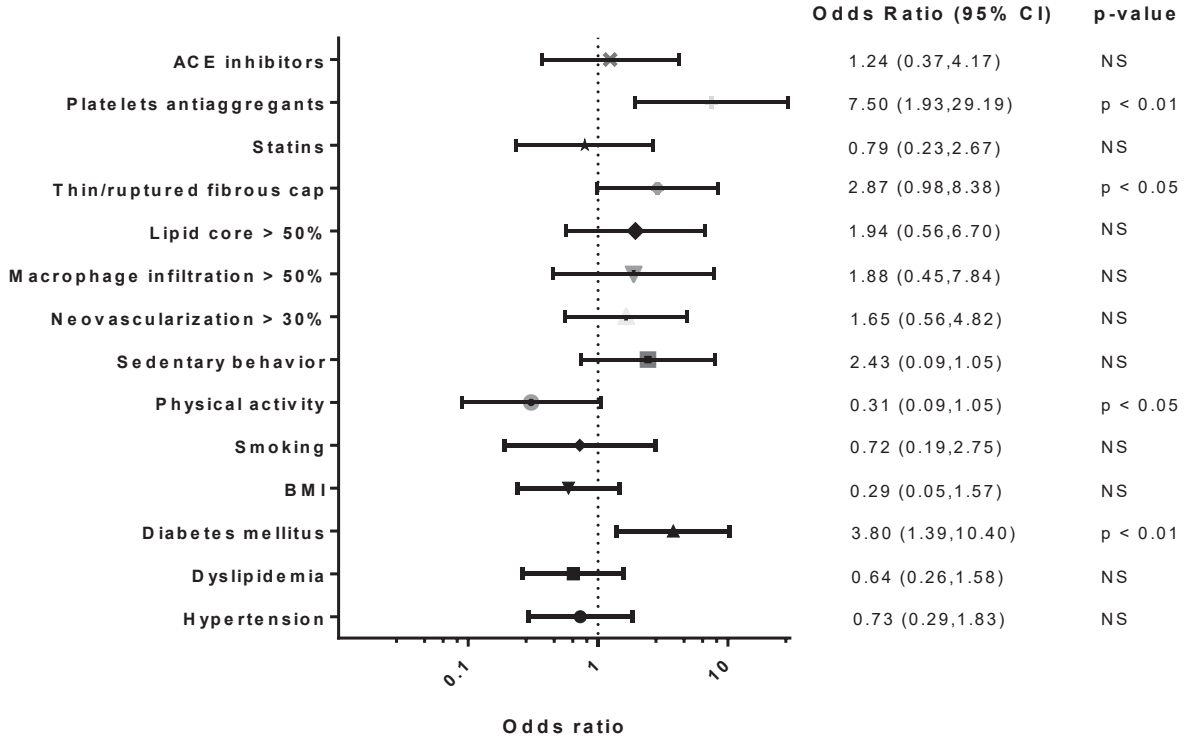
604

Figure 2.



The prevalence of non-hemorrhagic plaques is increased by PA level and decreased by SB level. A higher expression of Perls Blue was observed in the least physically active patient plaques (A; n=25) *vs*. the most physically active ones (n=25). A higher expression of Perls Blue was observed in the most sedentary patient plaques (B; n=25) *vs.* the least sedentary ones (n=25). A higher expression of Perls Blue was observed in the least physically active and most sedentary active patient plaques (n=13) *vs*. the most physically active and least sedentary active ones (n=13). A higher expression of Perls Blue was observed in plaques of patients practicing less than 900 MET-min/week (n=43) *vs*. more than 900 MET-min/week (n=32). *($p < 0.05$) significant difference compared to T1PA (A), compared to T1PA/T3SB (C), compared to < 900 MET-min/week (D); ¥ ($p = 0.08$) difference compared to T1SB (B).

627 Figure 3.



628

629 *The risk of intraplaque hemorrhage is negatively associated with physical activity level while it*
630 *is positively associated with diabetes mellitus, platelet antiaggregant treatment and the*
631 *presence of a thin or ruptured fibrous cap*.

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

Objectifs secondaires de l'étude 1 :

Ces résultats complémentaires n'ont pas été inclus dans l'article scientifique.

L'objectif secondaire de cette étude était d'évaluer l'impact de l'activité physique et de la sédentarité sur le stress oxydant plasmatique, potentiellement impliqué dans le processus de déstabilisation de la plaque.

Méthodes

Échantillons sanguins

Des échantillons sanguins ont été prélevés dans la veine céphalique dans des tubes contenant de l'éthilène diamine tétra-acétique (EDTA) quelques minutes avant la chirurgie. Les tubes ont été centrifugés à 3000rpm pendant 10min. Le plasma obtenu a été divisé en aliquots de 1mL et congelé à -80° pour analyses du stress oxydant.

Biomarqueurs du stress oxydant

La concentration en produits avancés de l'oxydation des protéines (AOPP) a été mesurée par spectrophotométrie. Elles ont été calibrées avec des solutions de chloramine-T en présence d'iodure de potassium absorbant à 340nm. Les concentrations sont exprimées en µmol. L^{-1} d'équivalents chloramine-T (Witko-Sarsat et al. 1998).

La concentration en malondialdéhyde (MDA), comme substance réactive thiobarbiturique, a été déterminée en extrayant le chromogène rose avec le n-butanol et mesurant son absorbance à 532nm par spectrophotométrie. Les concentrations en MDA sont calculées grâce au 1,1,3,3-tétrathoxypropane comme standard (Rayssiguier et al. 1993).

L'activité de catalase a été déterminée en utilisant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) comme substrat et le formaldéhyde comme standard. L'activité de catalase a été déterminée par le taux de formation du formaldéhyde induite par la réaction entre le méthanol et H_2O_2 utilisant catalase comme enzyme (Johansson and Borg 1988).

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) a été déterminée comme le taux d'oxydation de NADPH en NADP+ après ajout de glutathion reductase (GR), glutathion réduit (GSH) et NADPH, utilisant H_2O_2 comme substrat (Paglia and Valentine 1967).

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) a été déterminée par le degré d'inhibition de la réaction entre les radicaux superoxyde, produits par le système hypoxanthine – xanthine oxydase et le nitrobleu tétrazolium (Oberley and Spitz 1984).

Analyses statistiques

Les données biologiques sont exprimées en moyenne ± écart-type. Un test ANOVA univarié suivi d'un test de Newman-Keuls de comparaisons multiples ont été utilisés pour comparer les biomarqueurs du stress oxydant entre les tertiles d'activité physique et de sédentarité, ainsi qu'entre les groupes de MET.

Résultats

Le niveau de sédentarité augmente le stress oxydant plasmatique

Les concentrations plasmatiques d'AOPP étaient significativement plus élevées ($p < 0,05$) dans le T3SB comparé au T1SB respectivement 264,0 ± 188,6µmol/L vs 175,1 ± 63,89 mol/L ; Figure 1A). De plus, les concentrations plasmatiques de catalase étaient significativement plus élevées ($p < 0,05$) dans le T3SB comparé au T1SB (respectivement 1250,0 ± 959,7 µmol/L vs 757,7 ± 535,5µmol/L ; Figure 1B). Aucune différence significative n'a été observée pour les autres biomarqueurs (MDA, GPx, SOD) entre les tertiles de sédentarité.

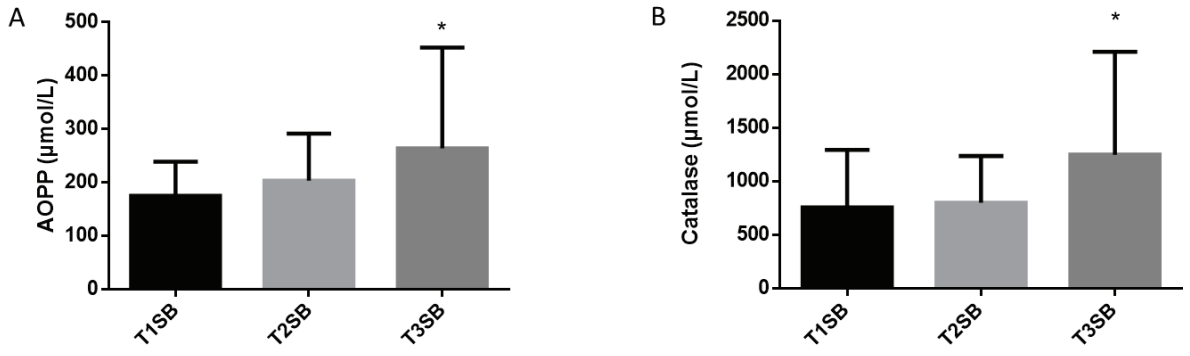


Figure 1. Biomarqueurs du stress oxydant de différents sous-groupes divisés selon leurs niveaux de sédentarité (T = tertiles). (A) concentration d'AOPP en µmol/L, (B) concentration de catalase en µmol/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD. *(p<0,05) différence significative comparée à T1SB.

Le niveau d'AP diminue le stress oxydant plasmatique

Les concentrations plasmatiques d'AOPP tendent à être plus élevées (p = 0.06) dans le T1PA comparé au T3PA (respectivement 259,1 ± 188,2µmol/L vs 182,9 ± 74,28µmol/L ; Figure 2A). De plus, les concentrations plasmatiques de MDA tendent à être plus élevées (p = 0,07) dans le T1PA comparé au T3PA (respectivement 458,8 ± 140,7µmol/L vs 370,0 ± 199,1µmol/L ; Figure 2B). Aucune différence significative n'a été observée pour les autres biomarqueurs (catalase, GPx, SOD) entre les tertiles d'AP.

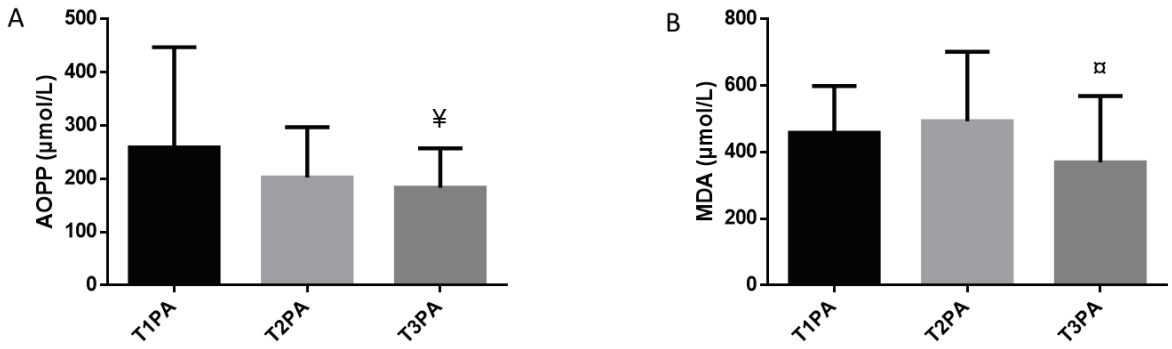


Figure 2. Biomarqueurs du stress oxydant de différents sous-groupes divisés selon leurs niveaux d'AP (T = tertiles). (A) concentration d'AOPP en µmol/L, (B) concentration de MDA en µmol/L. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD. ¥ (p<0,06) différence comparée à T1PA ; ¤ (p=0,07) différence comparée à T1PA.

Discussion

Ces résultats complémentaires montrent une augmentation significative du stress oxydant plasmatique avec le niveau de sédentarité (via les marqueurs AOPP et catalase) alors que l'AP régulière tend à le faire diminuer (via les marqueurs AOPP et MDA).

Comme préalablement expliqué dans le chapitre 5 de ce manuscrit, l'effet bénéfique de l'AP régulière sur le stress oxydant dans le contexte de l'athérosclérose a été bien étudié, en particulier en cas d'athérosclérose fémorale (Dopheide et al. 2015 ; Steven et al. 2017). De la même manière, bien qu'encore trop peu étudié, l'effet néfaste de la sédentarité sur le stress oxydant a été montré à plusieurs reprises (Bartfay and Bartfay 2014; Bouzid et al. 2014). Ainsi, nos résultats confirment les données de la littérature, dans une population homogène de patients asymptomatiques avec plaques carotidiennes avancées. Néanmoins, nous n'avons pas observé d'effet significatif de l'AP sur les enzymes antioxydantes (GPx, SOD et catalase) dans notre population suggérant que l'amélioration observée pourrait résulter d'une moindre production de ROS. De la même manière, nous avons pu observer une augmentation de l'activité enzymatique de catalase avec le niveau de sédentarité. Le rôle de la catalase étant d'accélérer la réaction de dismutation de H_2O_2, ce résultat pourrait refléter une augmentation du contenu en H_2O_2.

Toutefois, il est également important de prendre en considération quelques limites liées à cette étude dans l'analyse des résultats. En effet, nous n'avons pas évalué le régime alimentaire et l'apport en antioxydants non-enzymatiques de nos patients, pouvant potentiellement engendrer une hétérogénéité des réponses du stress oxydant. De plus, il s'agit d'une étude transversale (et non interventionnelle) nous permettant uniquement d'observer des différences entre les groupes sans pouvoir conclure sur un lien de cause à effet. Enfin, nous avons évalué le stress oxydant plasmatique de nos patients, qui ne reflète pas nécessairement l'état oxydatif dans la plaque d'athérosclérose. Ainsi, il serait intéressant dans de futures études, de confirmer ces données plasmatiques au cours d'études longitudinales, et d'évaluer le stress oxydant dans la plaque d'athérosclérose carotidienne.

ÉTUDE 2 : LES DEREGULATIONS IMMUNITAIRES A L'ORIGINE DE L'INFLAMMATION CHRONIQUE DANS L'ATHEROSCLEROSE SONT FAVORISEES PAR LA CYTOKINE PRO-INFLAMMATOIRE CCL5

Rahman A, Chudnovskiy A, Amadori L, Koplev S, David Amir E, Kim-Schulze S, **Mury P**, Fernandez N, Remark R, Li J, Pina C, Moss N, Faries C, Awad A, Bjorkegren J, Mocco J, Gnjatic S, Faries P, Maya'an A, Merad M, Giannarelli C.

Soumis dans *Nature Communications* (2017)

Les résultats de l'étude 1 fournissent des arguments quant à la relation entre le niveau d'activité physique quotidienne et les facteurs d'instabilité de la plaque d'athérosclérose carotidienne chez le patient asymptomatique à risque d'AVC, en particulier sur l'hémorragie intraplaque, mais aussi sur les paramètres inflammatoires. Néanmoins, à l'heure actuelle, les connaissances relatives au rôle de l'inflammation dans l'athérosclérose sont limitées à l'analyse de cellules inflammatoires circulantes, et principalement centrées sur les monocytes/macrophages. D'autres types de cellules immunitaires que les monocytes/macrophages pourraient être impliquées dans la physiopathologie (Libby et al. 2002a). Ainsi, il semble important à ce point d'analyser l'état fonctionnel des cellules inflammatoires dans la plaque d'athérosclérose afin de mieux comprendre les interactions potentielles qui pourraient conduire à la rupture de la plaque, indépendamment de l'activité physique et de la sédentarité.

Cette deuxième étude a été réalisée dans le cadre d'une mobilité internationale de 6 mois au sein du « Cardiovascular Research Institute » de l'Icahn School of Medicine at Mount Sinaï of New York City, dans l'équipe du Dr Chiara Giannarelli. L'ensemble des expérimentations réalisées lors de cette mobilité a été intégré à un article scientifique plus complet, présenté ici dans son intégralité. Cependant uniquement les expérimentations que j'ai réalisées sont détaillées et commentées par la suite.

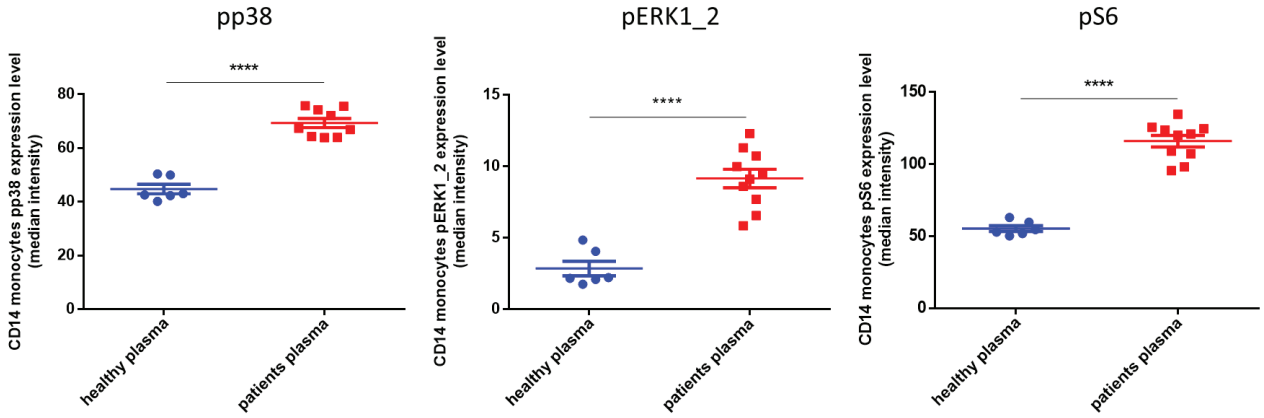
Afin de caractériser les dysfonctions du système immunitaire observées dans le contexte de l'athérosclérose, nous avons analysé, dans un premier temps, le profil protéomique des plaques avancées d'athérosclérose carotidiennes. Par la suite, j'ai évalué l'effet du plasma de patients symptomatiques et asymptomatiques sur la phosphorylation des protéines identifiées lors de l'analyse protéomique par l'intermédiaire de différents types de cellules immunitaires. Pour cela, j'ai stimulé des PBMC sains avec le plasma des patients et mesuré l'activation des phosphoprotéines par cytométrie de masse (CyTOF). Dans un second temps, j'ai évalué la production de cytokines pro-inflammatoires lorsque des PBMC sains étaient stimulés par du plasma de patients, afin de déterminer quelles cellules sanguines pouvaient favoriser l'activation

des phosphoprotéines. Enfin, l'objectif était de confirmer l'effet de la cytokine pro-inflammatoire identifiée lors de la 2ème étape sur les phosphoprotéines d'intérêt, et identifier la voie de signalisation associée. Ainsi, l'objectif principal de cette étude est donc de caractériser l'environnement immunitaire de la plaque d'athérosclérose afin d'apporter des éléments d'information à la mise au point de futures immunothérapies adaptées.

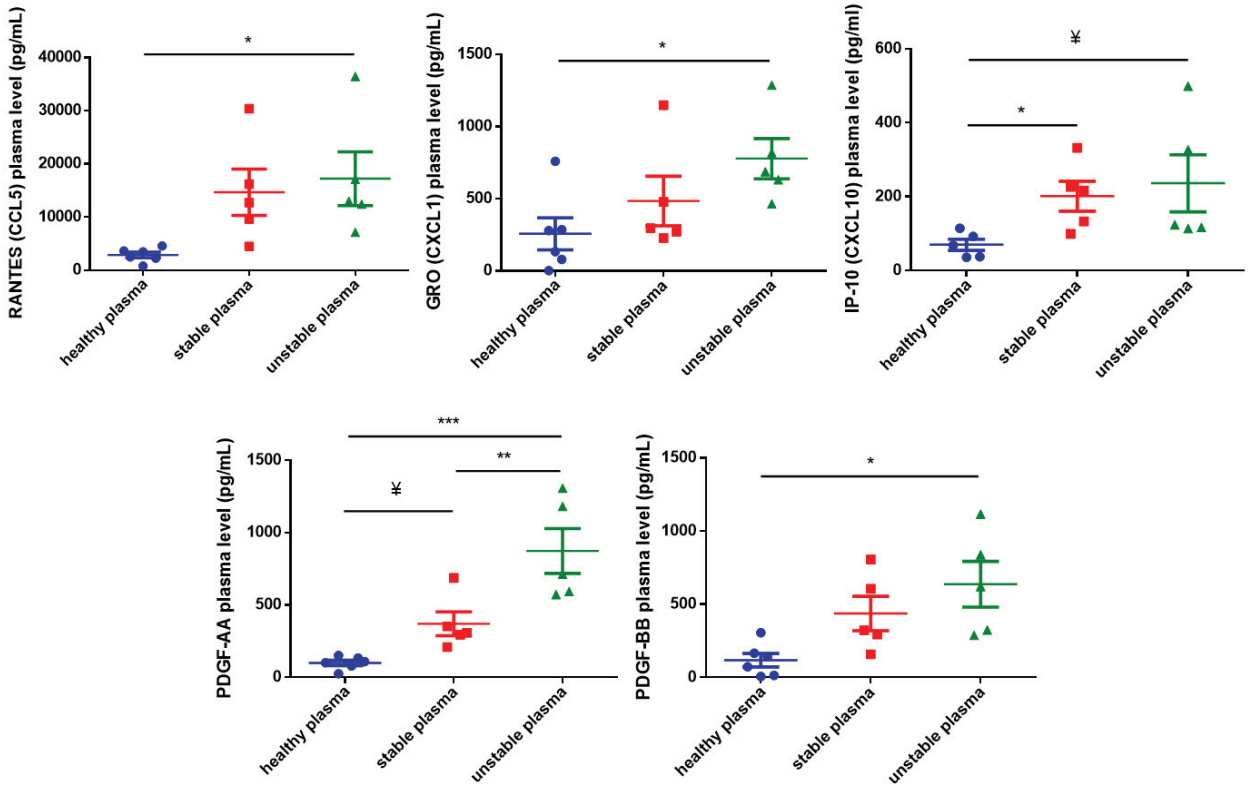
Les principaux résultats de cette partie de l'étude démontrent l'implication de la cytokine pro-inflammatoire CCL5 (ou RANTES) dans les dysfonctions du système immunitaire observées dans le contexte de l'athérosclérose. En effet, la stimulation de PBMC sains par cette cytokine permet une activation exacerbée de phosphoprotéines spécifiques, identifiées par analyse protéomique de plaques d'athérosclérose carotidiennes avancées par l'intermédiaire des monocytes.

Dans un premier temps, une analyse protéomique a été effectuée sur 15 plaques carotidiennes avancées extraites par endartériectomie. Cette première analyse a permis d'identifier 10 phosphoprotéines impliquées dans les dysfonctions du système immunitaire : IkBa, pCREB, pERK1/2, pMAPKAP2, pp38, pPLCg2, pS6, pSTAT1, pSTAT3, et pSTAT5.

Ensuite, nous avons évalué l'état fonctionnel des cellules immunitaires en stimulant des PBMC par le plasma des mêmes patients et analysé par cytométrie de masse l'activation des phosphoprotéines par l'intermédiaire de 10 populations de cellules immunitaires majeures (lymphocytes B, basophiles, CD1cDCs, lymphocytes T CD4, lymphocytes T CD8, monocytes CD14 et CD16, NK, NKT, pDCs). Cette étape nous a alors permis de voir que la meilleure réponse était faite par l'intermédiaire des monocytes et d'identifier les 3 phosphoprotéines les plus activées : pp38, pERK1/2 et pS6.

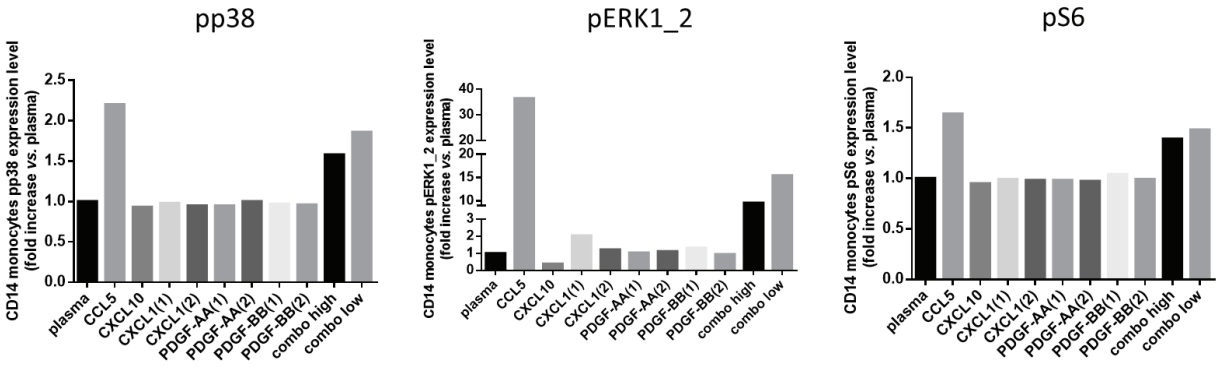


Simultanément, j'ai mesuré l'expression d'un panel de cytokines relarguées lorsque nous stimulions des PBMC par le plasma des patients. Ainsi, j'ai identifié les 5 cytokines pro-inflammatoires les plus exprimées : CCL5, CXCL1, CXCL10, PDGF-AA et PDGF-BB.

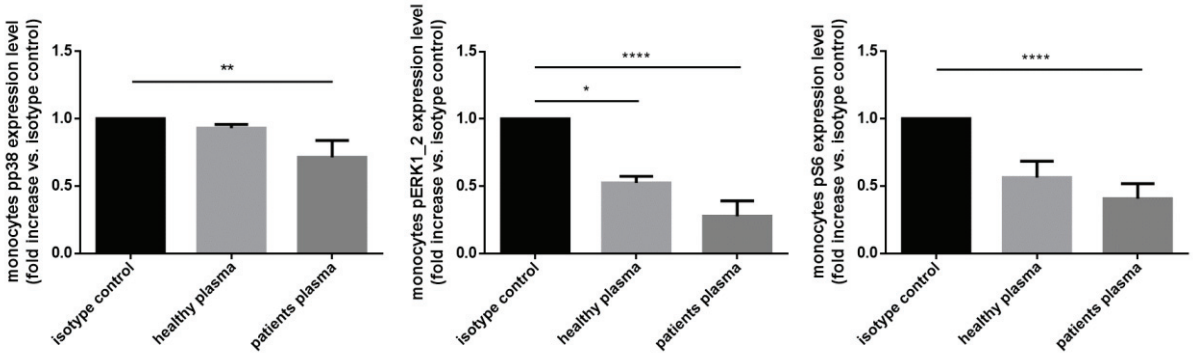


Dans une 3ème étape, j'ai ainsi évalué l'impact de chacune de ces 5 cytokines sur l'activation des 10 phosphoprotéines, ainsi qu'une combinaison des 5 cytokines, afin de mimer l'environnement plasmatique des patients souffrant d'athérosclérose. Les résultats de cette étape montrent alors

que seule CCL5 permet une activation exacerbée des 10 phosphoprotéines, et plus particulièrement de pp38, pERK1/2 et pS6, par l'intermédiaire des monocytes.



Lors d'une 4ème étape, nous avons alors confirmé l'impact de la cytokine CCL5 sur l'activation des phosphoprotéines en stimulant des PBMC sains par le plasma de patients auquel était ajouté un anticorps bloquant la cytokine. Cette expérimentation montre alors une diminution significative de l'activation des phosphoprotéines, en particulier lorsque les PBMC étaient stimulés par le plasma de patients. Ces résultats confirment alors l'implication de CCL5 dans la phosphorylation des protéines potentiellement impliquées dans les dysfonctions du système immunitaire.



Enfin, dans une dernière étape, nous avons déterminé la voie de signalisation menant à la phosphorylation des protéines via CCL5. Pour cela, nous avons évalué l'expression dans le tissu des principaux récepteurs de CCL5 : CCR1, CCR3 et CCR5, à l'aide d'une analyse par cytométrie de masse. Cette dernière expérimentation a permis de confirmer l'implication de l'axe CCL5/CCR5.

Ces résultats semblent très prometteurs quant à la mise au point d'immunothérapies spécifiquement adaptées. Néanmoins, des études complémentaires chez l'animal sont nécessaires afin de confirmer l'implication de l'axe CCL5/CCR5 dans les dysfonctions du système immunitaire observées dans le contexte de l'athérosclérose.

Title

A multidimensional single-cell approach identifies coordinated systemic and atherosclerotic tissue-associated immune alterations underlying human atherosclerosis

Authors

Adeeb H. Rahman[1,2,3,4,5], Aleksey Chudnovskiy[1,4], Letizia Amadori[5], Simon Koplev[6], El-ad David Amir[1,2,4], Seunghee Kim-Schulze[1,2,4], Pauline Mury[8,12], Nicolas Fernandez[6], Romain Remark[1,2,3,13], Jennifer R. Li[9], Christian Pina[9], Noah Moss[8], Christopher Faries[9], Ahmed J. Awad[10], Johan LM Bjorkegren[5], J. Mocco[10], Sacha Gnjatic[1,2,4,7], Peter Faries[9], Avi Maya'an[6,11], Miriam Merad[1,2,3,4], Chiara Giannarelli[1,5,8*].

Affiliations

[1]The Precision Immunology Institute, [2]Human Immune Monitoring Center, [3]Department of Oncological Sciences, [4]The Tisch Cancer Institute, [5]Department of Genetics and Genomic Sciences, [6] Department of Pharmacological Sciences, [7] Department of Medicine, Hematology and Medical Oncology Division, [8]Department of Medicine, Cardiovascular Research Center; [9]Department of Surgery, Vascular Division, [10]Cerebrovascular Center, Department of Neurosurgery, [11]Mount Sinai Center for Bioinformatics, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA; [12] Interuniversity Laboratory of Human Movement Biology EA7424, Claude Bernard University Lyon 1, Villeurbanne, France; [13]Present Address: Innate Pharma, 117 Avenue de Luminy, 13009, Marseille, France

*Correspondence: chiara.giannarelli@mssm.edu

Abstract

Atherosclerosis is a systemic disease characterized by focal immune infiltration of the arterial wall in response to lipid accumulation. While the role of inflammation in atherosclerosis has been extensively investigated, human studies have failed to take into account the heterogeneity of focal immune dysregulations at the atherosclerotic vascular site and systemic immune alterations in the same patient. Using single-cell mass-cytometry (CyTOF), combined with phospho-CyTOF, RNA-sequencing and cytokine profiling, we provide a first single-cell human immune atlas of atherosclerosis. We found that $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells largely dominate (>50%) advanced atherosclerotic lesions of high-risk patients undergoing carotid endarterectomy (CEA). Functionally, we show that atherosclerotic plasma drives systemic innate immune responses while promoting adaptive immune alterations at the atherosclerotic vascular site. The identification of distinct but coordinated systemic innate and atherosclerotic tissue-specific adaptive immune defects suggests that multiscale single-cell immune profiling may help the design of precise immunotherapies in patients.

Key words

Atherosclerosis, immune microenvironment, innate immunity, adaptive immunity, CyTOF.

The clinical manifestations of atherosclerosis — stroke and myocardial infarction (MI) — are responsible for nearly 50% of all deaths globally.[1-3] The therapeutic approach to atherosclerosis cardiovascular disease (CVD) consists of lifestyle improvements and control of hypercholesterolemia and other traditional cardiovascular (CV) risk factors. Yet, morbidity and mortality remain high and continue to rise globally, even in optimally treated patients. [4] Inflammation is intimately involved at all stages of atherosclerosis, which is accepted as a chronic inflammatory disease in response to vascular lipid accumulation. [5] Indeed, CVD is a major cause of mortality in patients with chronic autoimmune disorders and no hyperlipidemia. [6-10] Therefore, interventions targeting the immune system have become an attractive strategy to reduce residual CV risk. [11,12] The recent positive results of the endpoint driven Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS) trial [13] proved that targeting systemic innate immune responses, by inhibiting the pro-inflammatory cytokine IL-1β, can reduce the risk of non-fatal CV events by 17% in high-risk patients with recent MI and elevated high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP). Remarkably, a subgroup analysis revealed that patients who achieved the highest reduction of hsCRP had a 25% reduction in non-fatal events, suggesting a significant residual CV risk due to inflammation in this subset of patients.[14] These results provide the first proof-of-concept that anti-inflammatory treatments can prevent CV events, but the higher incidence of rate of infection deaths in older and diabetic patients also highlights the urgent need to identify new immune alterations to guide the design of precise immunotherapies in CVD patients. Significant advances in the field may have been hampered by technological limitations, with most human studies focusing on low-dimensional analyses of blood immune cells [15,16] and atherosclerotic tissue specimens [17,18], and the limited access to clinical samples. Recent advances in single-cell technologies have enabled unprecedented resolutions in studying small clinical samples and revealed the importance of cellular heterogeneity in driving disease biology [19,20]. Therefore, to map the immune landscape across atherosclerotic vascular tissue and paired blood of the same patient, we designed a single-cell immune profiling strategy combined with high-dimensional immune monitoring approaches (Figure

1). Using time-of-flight mass cytometry (CyTOF) [21] to simultaneously analyze atherosclerotic tissue and blood of the same patient — we found that $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells dominate the atherosclerotic vascular immune landscape and identified a new subset of $CD8^+$ T cells expressing low levels of CD127 significantly enriched atherosclerotic tissue relative to blood. Next, combining phospho-CyTOF, RNA sequencing (RNA-seq) and multiplexed cytokine arrays, we identified distinct systemic innate and tissue-specific adaptive immune responses in patients with atherosclerosis disease. Collectively, this multidimensional approach revealed heterogeneous immune cell variations across tissues in patients with atherosclerosis that can guide the design of new precise immunotherapies.

RESULTS

Paired Single-Cell Immune Profiling of Human Atherosclerosis

To map the immune landscape of atherosclerosis and discriminate between tissue-specific and systemic immune changes, we used a paired CyTOF approach [22] to perform simultaneous single-cell profiling of immune cells from atherosclerotic tissue and blood of the same patient. Table S1 summarizes the demographics and clinical characteristics of the patients (n=36) undergoing carotid endarterectomy (CEA) enrolled in our study. In an initial set of experiments, we performed a single-cell immune profiling of atherosclerotic lesions and paired blood from 15 prospectively enrolled CEA patients. First, immune cells isolated from atherosclerotic tissue and peripheral blood (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) of the same patient were barcoded using a CD45-based approach [23], pooled, immunostained with a cocktail of 32 antibodies (Table S2) and analyzed by CyTOF [21]. All analyzed lesions were classified according to validated pathology criteria of the American Heart Association (AHA) [24] as either complicated type VI (n=12; complex plaque with possible surface defect, hemorrhage, or thrombus) or type non-complicated IV-V (n=3; plaque with a lipid or necrotic core surrounded by fibrous tissue with possible calcification).

The relative phenotypic distribution of immune cells either infiltrating atherosclerotic tissue or in blood of the same patient was first analyzed using viSNE, [25] an unbiased computational tool that allows the visualization high-dimensional single-cell data into two dimensions. This unbiased approach immediately highlighted the presence of specific immune cell populations that were selectively enriched in atherosclerotic tissue relative to blood (Figure 2A). Next, we employed Phenograph [26] to cluster the identified cells into phenotypically related populations (Figure 2B), which were then manually annotated based on canonical marker expression patterns (Figure 2C). Using this unbiased computational pipeline we identified major immune cell populations in atherosclerotic tissue and in blood of the same patient (Figure 2D). The most prevalent immune cells ($CD45^+$) cells in atherosclerotic tissue were $CD4^+$ (25.8%) and $CD8^+$ (25.2%) T cells, macrophages (12.8%), monocytes (7.7%) and B (2.1%) cells. Among macrophages, unbiased cluster analysis identified two subsets defined as $CD64^+HLADR^{high}CD163^{low}$ and $CD64^+HLADR^{high}CD163^{high}$ (Figure 2C). The observation that — unlike in advanced murine atherosclerosis where only a few T cells are detected[27]— $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells together dominate (>50%) advanced atherosclerotic lesions, indicate a strong adaptive immune signature in advanced atherosclerotic lesions of high-risk patients undergoing CEA. Multiplexed immunohistochemistry [28] confirmed that T cells comprised a major portion of the $CD45^+$ cells in the same atherosclerotic lesions analyzed by CyTOF (Figure S1). Using a regression analysis similar to that employed by CITRUS, [29] we identified cell types and subsets that were differentially enriched in atherosclerotic tissue and blood across all patients (Figure 2E). This analysis showed a significant relative enrichment of $CD14^+$ monocytes and NK cells in blood, while, as expected, macrophages were enriched in atherosclerotic tissue. Notably, we also identified a novel, phenotypically distinct subset of $CD8^+$ T cells that were significantly enriched in atherosclerotic tissue, which were characterized by low expression levels of CD127 (IL-7R α-chain) (Figure 2E). In a second independent set of CyTOF experiments conducted on a separate cohort of 10 CEA patients, we confirmed a significant atherosclerotic tissue enrichment of total $CD8^+$ T cells

(2.6±2.3 fold–change vs. blood; p=0.03) and in particular of the new subset of $CD8^+$ $CD127^{low}$ T cells (4.7±5.1 fold–change vs. blood; P=0.01).

Systemic Immune Responses in Atherosclerosis Patients

To dissect the complexity of systemic immune responses in patients with atherosclerosis, we used a multiscale profiling strategy integrating single-cell phospho-CyTOF, RNA-sequencing (RNA-seq), secreted cytokine profiling and unbiased computational approaches. Blood immune cells from patients with atherosclerosis were perturbed *ex-vivo* using either autologous plasma or plasma from healthy donors, an approach that was previously used to unveil alterations in IL-1 signaling in systemic onset juvenile idiopathic arthritis. [30] First, we used phospho-CyTOF to interrogate the activation of major signaling pathways across all major immune cell subsets using a panel of antibodies against 18 surface markers and 10 intracellular phospho-proteins in each single-single cell (Table S2). To identify cell subset–specific signaling responses, we first applied viSNE to visualize and identify 10 major immune cell populations (B cells, Basophils, CD1c DCs, CD4 T cells, CD8 T cells, CD14 and CD16 monocytes, NK cells, NK T cells, and pDCs) on the basis of canonical surface marker expression patterns (Figure S2). Next, we evaluated the relative level of phosphorylation of 10 intracellular proteins (IkBa, pCREB, pERK1/2, pMAPKAP2, pp38, pPLCg2, pS6, pSTAT1, pSTAT3, and pSTAT5) across this immunological map, allowing the analysis and visualization of intracellular pathways that were differentially activated in each single-cell in response to plasma of atherosclerosis patients. These data were integrated to derive 100 cell type-phosphoprotein pairs that were compared across all the different plasma treatments. $CD14^+$ monocytes and $CD1c^+$ DCs exhibited the greatest intracellular signaling activation, showing significantly increased phosphorylation of CREB, p38, ERK1/2, MAPKAP2 and S6 in response to autologous atherosclerotic plasma (Figure 3A-D), revealing an inducible innate immune signature in blood cells of patients with atherosclerosis.

To determine whether these immune responses were dependent on atherosclerotic plasma stimulation or due to intrinsic features of immune cells from patients, blood immune cells of healthy donors were perturbed by plasma of atherosclerosis patients. We used the same panel of 18 surface markers and 10 intracellular phospho-proteins and a consistent computational analysis strategy. Results showed that healthy blood immune cells largely recapitulated the immune activation signature that was observed in blood immune cells of patients (Figure 4A), suggesting that activation of these signaling pathways is largely driven by soluble factors in atherosclerotic plasma rather than intrinsic features of blood immune cells of patients. In particular, $CD14^+$ monocytes and $CD1c^+$ DCs exhibited the greatest immune activation, showing significantly elevated phosphorylation of CREB, p38, MAPKAP2, ERK1/2 and S6 in response to atherosclerotic plasma (Figure 4B; Figure S3).

To identify the correspondent transcriptional signature associated with the activation of these signaling pathways, we performed RNA sequencing (RNA-Seq) analysis in parallel experiments using the same healthy blood immune cells and atherosclerotic plasma. Principal component analysis (PCA) of all mapped genes and of corresponding CyTOF data (Figure 4C) clearly separated blood immune cells perturbed by atherosclerotic plasma from those stimulated with plasma of healthy donors. Differential expression of RNA-Seq data using the DESeq package identified 4,823 differentially expressed genes (DEGs, FDR 5%) out of 39,129. Of all identified DEGs, 2,377 were up- and 2,446 down-regulated, suggesting a substantial transcriptional reprogramming in blood immune cells perturbed by plasma of atherosclerosis patients compared to healthy donors (Figure 4D and E; Table S3). Gene set enrichment including Gene Ontology (GO) analysis using *Enrichr* [31] confirmed the involvement of several biological processes relevant for innate immune responses (Figure S4) including protein transport, cell-cell signaling and increased chemotaxis (Figure 4D and Table S4). For the DEGs, KEGG and PANTHER pathway enrichment analyses identified a series of up-and down-regulated signaling pathways implicated in the immune response to atherosclerotic plasma perturbation, including inflammation mediated by chemokine and cytokine, interleukin signaling pathways, PDGF signaling, antigen processing and presentation,

PI3 and MAPK signaling pathways (Figure S5A and Table S5). Together, these results imply that plasma of atherosclerosis patients induces an inflammatory transcriptional reprogramming, likely initiated by the activation of intracellular signaling pathways in $CD14^+$ monocytes and $CD1c^+$ DCs.

To discover regulatory relationships between cell type-signaling pathways and gene expression, we next integrated GO enriched gene expression data with pairs of cell type-phosphoprotein activity identified by CyTOF (Figure 5A and B). Filtered cross-correlations of mass cytometry and gene expression data identified CREB phosphorylation in monocytes and $CD1c^+$ DCs and S6 in monocytes as top correlates (Figure 5C), suggesting a key role of these cell type-signaling pathways activation in explaining the identified gene signature. In line with this possibility, enrichment analysis of the DEGs for targets of transcription factors (TF), as determined by prior knowledge ChIP-seq studies from ENCODE and ChEA [32] and consensus binding DNA sequence motifs based on position weight matrices from TRANSFAC and JASPAR, identified CREB1, CREM (a CREB family member) [33] and E2F1 as the TFs that cooperates in the regulation of CREB signaling [34,35]. Remarkably, CREM was a top DEGs in our dataset (Table S3). Hence, these TFs likely explain part of the differential expression of genes identified in blood immune cells in response to patient plasma (Figure S5B; Tables S6 and S7). Considering that CREM is a CREB family member and that CREB is activated in response to the phosphorylation of multiple kinases including S6 [36], these data indicate that S6 and CREB phosphorylation, observed in monocytes, is a critical event contributing to the inflammatory transcriptional response triggered by atherosclerotic plasma.

Finally, to evaluate the downstream consequences of these intracellular signaling and transcriptional pathways, we profiled secreted cytokines by multiplexed analysis and identified an atherosclerosis-specific signature (Figure S6). Among other cytokines, we found a significant increase of IL-6, which is associated with increased risk of cardiovascular mortality in patients, [37] and of the chemokines MCP-1 and fractalkine, which have been implicated in monocyte/macrophage and T cell recruitment to tissue. [38,39] Altogether, these data provide a new

pro-atherogenic secretome signature that defines blood immune cells responses to plasma of patients with atherosclerosis.

Unbiased Single-Cell Functional Screening of Plasma Candidate Cytokines

Our previous results suggest the presence of soluble factors in atherosclerotic plasma with the potential to induce innate immune activation. Given that cytokines modulate immune responses in inflammatory conditions including atherosclerosis, [40] we profiled the plasma cytokine signature of each patient and healthy donor used for the phospho-CyTOF experiments (Figure 6A and B) to identify potential candidates. Among 11 differentially expressed cytokines we selected the top-five for proof-of-concept screening studies using phosphoCyTOF: CCL5 (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted; RANTES), CXCL10 (IP-10), CXCL1 (GRO), PDGF-AA and PDGF-BB (Figure 6B). Results showed that CCL5, a chemokine implicated in atherosclerosis with conflicting results [41], reproduced the same intracellular immune activation profile observed in monocytes in response to atherosclerosis plasma perturbations (Figure 6C and D). A blocking antibody against CCL5 significantly reduced plasma-induced monocyte activation, further confirming a key role for this chemokine in driving atherosclerotic inflammation (Figure 5E). However, we observed a persistent activation of signaling pathways in $CD1c^{+}$ DCs and in a small subset of $CD14^{low}$ monocytes in the presence of CCL5 inhibition. These data reveal new mechanisms by which plasma CCL5 contributes to systemic immune activation of circulating monocytes of patients with atherosclerosis, but also suggest that the residual plasma-induced immune activation in a small subset of $CD14^{low}$ monocytes and in $CD1c^{+}$ DCs observed in the presence of CCL5 inhibition is likely sustained by other soluble factor(s) present in blood.

Adaptive Immune Responses in Atherosclerotic Lesions of Patients

Based on the effects elicited by atherosclerotic plasma on blood immune cells — and given that intra-lesional blood leakage from intimal neovessel is a well-recognized phenomenon implicated with atherosclerotic plaque growth and rupture [42] — we hypothesized that plasma extravasation may

induce specific immune responses at the atherosclerotic vascular site. We therefore developed an *ex vivo* atherosclerotic tissue culture model to investigate discrete immune dysregulations elicited by atherosclerotic plasma in tissue (Figure 7A) [43]. First, atherosclerotic tissue from CEA patients was perturbed by autologous plasma. Next, we profiled secreted cytokines in the supernatant of cultured tissues and identified an atherosclerotic tissue-specific signature dominated by the production of CCL5, IFN-γ, Fractalkine and Fms like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L) (Figure 7B and C). In particular, atherosclerotic tissue perturbed by autologous plasma was a major source of the chemokine CCL5 (24 fold-change) compared to perturbed blood cells (0.9 fold-change). Given that CCL5 has been implicated in mediating T cell chemotaxis at the site of inflammation through the G protein-coupled chemokine receptor CCR5 [44,45], we next investigated the expression levels of CCR5 in T cell immune populations found in atherosclerotic tissue and paired blood. We found that CCR5 expression was significantly higher on $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells infiltrating atherosclerotic tissue relative to blood (Figure 7D and E). CCR5 expression was particularly elevated in the novel subset of $CD127^{low}CD8^+$ that we found to be selectively enriched in atherosclerotic tissue (Figure 2E), accounting for most of the $CCR5^+CD8^+$ T cells enriched in atherosclerotic tissue. These data suggest that recurrent plasma leakage in advanced atherosclerotic lesions may trigger the expression of chemokine like CCL5 and contribute to the recruitment of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, and in particular of a new subset of $CD127^{low}CD8^+$ T cells, in advanced atherosclerotic lesions of high-risk CEA patients.

DISCUSSION

By coupling deep-phenotypic analyses with immune functional studies across atherosclerotic tissue and blood, we provide an unprecedented granular system view of the immune system in patients with atherosclerosis. Paired single-cell analyses of atherosclerotic tissue and blood revealed a previously unappreciated heterogeneity of immune cell infiltrating the human atherosclerotic arterial wall. We identified $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell as the dominant immune cell populations in advanced atherosclerotic lesions of high-risk patients undergoing carotid endarterectomy (CEA). Although,

the presence of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in human atherosclerosis and their role in the disease has long been documented, [46-48] previous human studies focused on single cell populations and did not systematically investigate correlations between identified cell types and subsets infiltrating atherosclerotic tissue and in blood of the same patient. Using this approach, we identified a new subset of $CD8^+$ T cells characterized by low expression of CD127 and found that this subset of cells was highly enriched in atherosclerotic tissue relative to blood of the same patient. While the immune landscape of advanced atherosclerotic lesions appeared dominated by adaptive immune alterations, we identified systemic innate immune dysregulations in blood of the same patients. In particular, single-cell functional studies revealed innate immune activation characterized by the phosphorylation of specific intracellular kinases in $CD14^+$ monocytes and $CD1c^+$ DCs when blood immune cells of patients were stimulated with autologous atherosclerotic plasma. This response was reproduced in blood cells from healthy donors perturbed by plasma of atherosclerosis patients, indicating that the observed innate immune response was mostly dependent on atherosclerosis plasma stimulation and not explained by intrinsic features of immune cells from patients. RNA-seq analysis revealed an inflammatory signature involving innate immune related biological processes and pathways including chemotaxis, innate immune responses, inflammation mediated by chemokine and cytokine, interleukin signaling pathways. Integrated analyses of phospho-CyTOF and RNA-seq data identified CREB and S6 activation in monocytes and dendritic cells as a major contributor to this inflammatory transcriptional signature. Indeed, CREB is a phosphorylation-dependent transcriptional factor that plays an important role in the regulation of immune responses that follow the phosphorylation of S6, p38 and MAPKAPK2 [36] that were activated by atherosclerotic plasma, suggesting that CREB is a critical checkpoint. In proof-of-concept studies, designed to identify potential plasma mediators of this innate immune response, we used phosphoCyTOF to screen the immune activating potential of the top 5 differentially expressed cytokines identified in plasma of patients and healthy donors. We found that CCL5 reproduced the functional activation of

monocytes to atherosclerotic plasma and that this effect was largely abolished by its targeted inhibition.

Our immune functional studies also revealed that, while atherosclerotic plasma drives systemic innate immune responses in blood, it also shapes distinct adaptive immune alterations in advanced atherosclerotic lesions. In particular, we provide new evidence suggesting that recurrent plasma leakage occurring in advanced complicated atherosclerotic lesions may contribute to plaque progression toward an advanced inflammatory phenotype by triggering the recruitment of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, which we found the dominant cell type in advanced atherosclerotic lesions of high-risk CEA patients. We found that the CCL5/CCR5 axis may contribute to this effect, as atherosclerotic tissue perturbed by autologous plasma was a major source of the chemokine CCL5, and infiltrating $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in the tissue express high levels of the CCL5 receptor CCR5. Although the role of CCL5/CCR5 axis in CVD has been extensively investigated in preclinical and clinical studies, some discrepant results have been reported [37,41,49-55], genetic polymorphisms of CCL5/CCR5 were not conclusively associated with CVD [56-59], and recent studies show protective effects[60,61]. Our unbiased approach identifies a new dual functional role for the CCL5-CCR5 axis in patients with atherosclerosis disease, with CCL5 mediating the activation of circulating monocytes in blood immune cells induced by atherosclerotic plasma, and also shaping the adaptive immune landscape of advanced atherosclerotic lesions of high-risk patients through the recruitment of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell and in particular of a new subset of $CD8^+$ T cells characterized by the low expression of CD127 that we found to be significantly enriched in atherosclerotic lesions.

In conclusion, our multidimensional single-cell approach enabled immune monitoring studies using small limited clinical atherosclerotic tissue samples and blood of the same patient and provided a system view of the immune system across tissues of patients with advanced atherosclerosis. This approach uncovered novel distinct but coordinated systemic innate and atherosclerotic-tissue specific adaptive immune alterations underlying human atherosclerosis that can contribute to guide the design of new data-driven personalized immunotherapies in atherosclerosis.

ACKNOWLEDGMENTS: We thank the Human Immune Monitoring Center (HIMC) for their excellent support throughout the project, in particular Oksana Mayovska, Victor Guo, Xiaochen Ivy Qin, Hui Emily Xie and Manishkumar Patel. This work utilized mass cytometry instrumentation supported by NIH S10OD023547-01. We thank the Biorepository and Pathology Core and the Genomics Core Facility of the Icahn School of Medicine at Mount Sinai. C.G. is funded by NIH grants K23HL111339, R03HL135289, R21TR001739 and UH2TR002067; The Leducq Foundation Consortium "CAD Genomics". JLMB is funded by the NIH R01HL125863 and the The Leducq Foundation Consortium "CAD Genomics". JLMB is shareholder of Clinical Gene Networks AB ("CGN") and member of the board of directors.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

Conceptualization: C.G., M.M., and A.R.; Methodology: C.G., M.M., A.R. E.D.A., A.M. and S.G.; Software: E.D.A. A.M.; Formal Analysis: A.R., S.K., E.D.A., S.K., N.F., A.M. Investigations: A.R., A.C., L.A., S.K.S., P.M., R.R., J.L.M.B.; Resources: J.R.L., C.P., N.M., C.F., A.J.A, J.M., P.F. and A.M.; Data Curation: A.R., E.D.A., S.K., S.K-S., and A.M.; Writing – Original: C.G., A.R.; Writing – Review & Editing: C.G., A.R., M.M, S.K.-S and A.M.; Visualization: C.G., A.R., S.K., A. C., L.A. and A.M; Supervision: C.G., A.R., S.K-S, A.M. and M.M.; Project Administration: C.G.; Funding Acquisition: C.G.

METHODS

Human Specimens and Patient Clinical Characteristics

Thirty-four patients undergoing carotid endarterectomy at the Mount Sinai Hospital were enrolled in an ongoing clinical study approved by the Institutional Review Board of the Icahn School of Medicine at Mount Sinai (IRB 11-01427). Eligible subjects gave informed, written consent to participate to the study. Exclusion criteria were: current infection, autoimmune disease, active or recurrent cancer, severe renal failure requiring dialysis, peripheral arterial occlusive disease with rest pain. Peripheral venous blood and atherosclerotic specimens collected from 15 patients

undergoing carotid endarterectomy were used to investigate tissue and blood heterogeneity. Plasma isolated from peripheral blood of 26 patients was used for functional CyTOF studies. Peripheral blood and atherosclerotic specimens of 8 patients were used to investigate CCR5 expression in tissue-infiltrating immune cells.

Table S1 summarizes the demographic and clinical characteristics of the patients. The 36 patients consisted of 19 males and 17 females and mean age was 73.3±9.7 years, with a median of 73.5. Healthy donors (n=10) were enrolled from the Mount Sinai Hospital staff and PBMCs and plasma were freshly isolated the day of the experiment.

Sample Collection

From the patients described above, fasting blood was collected pre-/intra-operatively into tubes containing ACD Solution A as anti-coagulant (BD Vacutainer). Carotid atherosclerotic tissue specimens were immediately placed in RPMI media (Corning) on ice.

Plasma and Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Isolation from Blood

Blood was processed within 2 hours of collection and spun at 1500 rpm for 6 minutes. Plasma was collected and the cell fraction was diluted with Phosphate Buffered Saline (PBS) (ratio 1:2). Diluted blood suspension was overlaid over the top of Ficoll-Paque Plus (ratio 7:3) (GE Healthcare Life Sciences) and centrifuged for 20 minutes at 1800 rpm at room temperature. After centrifugation the PBMC layer was collected, washed in PBS according to the standard operating procedure (SOP) for PBMCs isolation of the Human Immune Monitoring Center of the Icahn School of Medicine at Mount Sinai.

Cell Dissociation from Atherosclerotic Plaques

The atherosclerotic surgical specimens were processed within one-hour post-surgery. The plaque sample was washed extensively in DMEM media, then the tissue was weighted and digested at 37° C for 1 hour in 10 milliliters (ml) of the following enzyme mix as previously described [62]. DMEM media, 10% fetal bovine serum (FBS), collagenase type IV (Sigma, C5138) at a final concentration

of 1mg/ml, DNase (Sigma, DN25) at a final concentration of 0.3mg/ml, hyaluronidase (Sigma, H3506) at a final concentration of 0.3 mg/ml, collagenase type XI (Sigma, C7657) at a final concentration of 0.3 mg/ml. After digestion the mixture was transferred into 50 ml falcon conical tube and vortexed for 5 min at highest speed. The digested sample was filtered twice through 70 µm cell strainer and spun down at 1600 rpm for 10 min. The suspension was processed using the Dead Cell Removal kit (Miltenyi Biotec 130-090-101) according to manufacturer instructions using LS columns (Miltenyi 130-042-401).

CyTOF paired sample preparation

Following digestion and dead cell removal, cells isolated from atherosclerotic plaque specimens and paired PBMCs from the same patient were each barcoded using a CD45-based approach optimized for scarce clinical samples [23], then pooled and stained using a panel of antibodies routinely used at the Human Immune Monitoring Core of the Icahn School of Medicine at Mount Sinai. A summary of all mass cytometry antibodies, clones, reporter isotopes used for the immunophenotype experiments can be found in Table S2. Antibodies were either purchased pre-conjugated from Fluidigm or purchased purified and conjugated in-house using MaxPar X8 Polymer Kits (Fluidigm) according to the manufacture's instructions. The samples were then washed and stained with cisplatin as a viability dye [63], then washed and fixed and permeabilized with BD Cytofix/Cytoperm (51-2090KZ) and stored in freshly diluted 2% formaldehyde (Electron Microscopy Sciences) in PBS containing 0.125nM Ir nucleic until acquisition.

Multiplexed Immunohistochemistry

Five µm formalin-fixed tissue sections obtained from same tissues analyzed by CyTOF, were baked overnight at 37°C and then deparaffinized, rehydrated, and pretreated in appropriate buffer for antigen retrieval (Target Retrieval Solution, Dako). After endogenous peroxydase inhibition with H_2O_2 and FcR blocking, CD45 cells were stained with an anti-CD45 monoclonal antibody (clone 2B11+PD7/26, mouse IgG1, Dako) for 1 hour at room temperature. After signal amplification with

an HRP-labeled polymer (Dako), enzymatic activity was revealed using 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Vector Laboratories). Then slides were counterstained using hematoxylin and mounted in aqueous-based mounting medium (glycergel, Dako). After image acquisition using a whole slide scanner, the slides were subjected to the Multiplexed Immunohistochemical Consecutive Staining on Single Slide protocol [28] and stained for CD68 (clone KP1, mouse IgG1, Dako) and CD3 (clone 2GV6, rabbit IgG, Ventana). After each round of staining, slides were scanned before de-staining steps.

Stimulation of PBMCs with atherosclerosis plasma and phosphosignaling analysis Stimulation and cellular staining protocols were based on protocols described by Bendall et al. [21]. Briefly, freshly isolated PBMCs of healthy donors were resuspended in RPMI-1640 medium (Corning Cellgro, VA, USA) containing 1% fetal bovine serum (BioWest), 1x penicillin/streptomycin (Invitrogen), diluted at $2x10^6$ cells/ml, plated into a 96-well deep well plate for stimulation at 37°C, 5% CO_2. Rh103 nucleic acid intercalator (Fluidigm Inc) was added to cells as a viability marker at a final concentration of 0.125nM for the final 15 min of incubation. CCL5 blocking antibody (Anti-Human CCL5, clone 16411. R&D) was incubated with patient or healthy donor plasma for 30 minutes, prior to adding plasma to the cells (final concentration 20%). Signal transduction was stopped and stabilized by fixing the cells with formaldehyde (Thermo Scientific, IL, USA) added directly to the media at a final concentration of 1.6% for 10 minutes at room temperature. To minimize experimental variability and facilitate the accurate detection of differences in phospho-protein expression between samples, PBMC samples in a given experiment were barcoded using Cell-ID 20-plex Pd barcoding kit (Fluidigm Inc.) and pooled prior to staining. Samples were first labeled with a panel of cell surface antibodies to identify major immune subsets, and then fixed and permeabilized with ice-cold methanol prior to staining with a panel of antibodies against intracellular phospho-protein epitopes. Samples were then washed and stored in freshly diluted 2% formaldehyde (Electron Microscopy Sciences) in PBS containing 0.125nM Ir nucleic until acquisition.

Mass cytometry data acquisition and processing

Immediately prior to acquisition, samples were washed with PBS and diH_20, counted and resuspended at a concentration of 1 million cells per ml in diH_20 containing a 1/20 dilution of EQ 4 element beads (Fluidigm Inc.). Samples were acquired on a CyTOF2 using a SuperSampler fluidics system (Victorian Airships) at an event rate of <400 evts/s. Following acquisition, all data were normalized using the Helios normalizer software (Fluidgm Inc.) and barcoded samples were deconvoluted and cross sample doublets were filtered using a Matlab-based debarcoding application [64]. Data were uploaded to Cytobank for subsequent analysis and visualization.

CyTOF Data Visualization and analysis

CyTOF data analysis and visualizations were performed using Cytobank (www.cytobank.org; *https://mtsinai.cytobank.org/cytobank/;* Cytobank, Inc., Menlo Park, CA). For analysis of tissue associated inflammatory cells and matched PBMCs, we employed an R-based semi-automated data analysis pipeline developed at the Human Immune Monitoring Center of the Icahn School of Medicine at Mount Sinai. This pipeline employs viSNE [25] as a dimensionality-reducing visualization tool and Phenograph [26] as an automated clustering algorithm. Clusters are manually annotated based on canonical marker expression patterns, and a CITRUS-style regression analysis is used to identify stratifying signatures between sample groups [29]. Phospho-signaling experiments were first analyzed in Cytobank by applying viSNE analyses on cell surface markers to facilitate multidimensional clustering and consistent manual identification of major immune subsets based on canonical marker expression patterns. Expression of the phospho-proteins was visualized as a third parameter on the viSNE map to compare relative expression across immune subsets. For subsequent downstream analyses, the median signal intensity of each phospho-protein was calculated and exported for each of the manually identified immune populations in each sample.

Secreted Soluble Factor Profiling of Tissue and PBMCs

Atherosclerotic surgical fresh specimens (n=6) were cut into homologous small pieces (3 x 3 x 3

mm) and cultured in RPMI-1640 medium (Corning Cellgro, VA, USA) with or without autologous plasma for 24 hours and the supernatant was collected and stored it at -80 °C for Luminex Multiplex Assay. Culture supernatant of PBMCs stimulated with or without atherosclerotic plasma was collected after 24 hours and stored at -80°C for Luminex Multiplex assay.

Measurement of Multiplex Biomarkers

Culture supernatant and plasma cytokines/chemokines were measured using a commercially available human cytokine/chemokine magnetic bead panel (MILLIPLEX MAP, HCYTMAG-60K-PX41) as per the manufacturer's instructions on Luminex-200 multiplex immunoassay system. Data were analyzed using Milliplex Analyst 5.1 software (EMD Millipore, Billerica, Massachusetts). Cytokine expression by PBMCs and cultured tissue was calculated by normalizing each cytokine value in the supernatant for the concentration of each corresponding cytokine in plasma as follow: net-release (pg/ml) = supernatant concentration (pg/ml) – 20% plasma concentration (pg/ml). Cytokine expression was computed using paired two-tailed t-test for PBMCs of atherosclerotic patients treated with autologous plasma, while regular population-based t-test was used for the analysis of cytokines released by healthy PBMCs treated with atherosclerotic plasma.

RNA-seq library preparation and sequencing

Total RNA samples of healthy PBMCs perturbed by atherosclerotic patient or healthy donor plasma were extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Extracted RNA samples underwent quality control assessment using the Agilent Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA) and all RNA samples submitted for sequencing had an RNA Integrity Number (RIN) >9, with a minimum of 1 μg input RNA. Poly-A library preparation and sequencing were prepared with the TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Ilumina, San Diego, CA) at the Genomics Core Facility at the Icahn School of Medicine at Mount Sinai as per standard protocols. The prepared libraries were then sequenced using Illumina HiSeq 4000 with single-end at read length of 100 base pairs with two technical replicates per plasma treatment.

Differential RNA-seq of plasma-induced PBMCs

Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) [65] was used to map reads to the human genome (GRCh38, Gencode version 24) and count the number of reads per transcript. The transcript counts were analyzed using a negative binomial test implemented in the DESeq R package [66] with normalization based on size factors. The resulting p-values were corrected for multiple hypothesis testing using a Benjamini-Hochberg correction [67]. For the RNA-seq PCA, log pseudo-counts (n + 1) normalized by size factors were used. Up- and down-regulated lists of genes were called with an adjusted p-value threshold of 0.05, corresponding to a false discovery rate (FDR) of 5%. This analysis yielded 4,823 DEGs.

Gene signature enrichment

To interpret the identified up- and down-regulated genes associated with plasma induction of bulk PBMCs, gene symbols were submitted to *Enrichr* [31,68]. The highlighted results from *Enrichr* gene set libraries and the reported scores were selected based on rank-based and combined score statistics from *Enrichr* [31,68]. Enriched upstream TFs were supported by ChIP-seq data and position weight matrix (PWM) prediction libraries and inferred using *Enrichr* as described [31,68]. The results of the TF enrichments were ranked based on the combined *Enrichr* score: the product of the negative log p-value from Fisher's exact test and the z-score of the deviation from the expected rank. Enriched GO terms were scored by the rank-based z-score alone. Pathway enrichment was evaluated based on p-values from the Fisher's exact test.

Heat maps

All heat maps were rendered in R and ordered based on hierarchical clustering with an Euclidian distance metric and complete linkage, unless otherwise specified. Batch corrections were applied to aggregate mass cytometry data and multiplex plasma cytokine data using Empirical Bayes batch correction (Combat) [69]. Standardized data (z-scores) were calculated for each feature by subtracting the estimate mean and dividing by the estimate standard deviation.

REFERENCES

1 Cholesterol Treatment Trialists, C. *et al.* Lack of effect of lowering LDL cholesterol on cancer: meta-analysis of individual data from 175,000 people in 27 randomised trials of statin therapy. *PloS one* **7**, e29849, doi:10.1371/journal.pone.0029849 (2012).

2 Mensah, G. A., Moran, A. E., Roth, G. A. & Narula, J. The global burden of cardiovascular diseases, 1990-2010. *Global heart* **9**, 183-184, doi:10.1016/j.gheart.2014.01.008 (2014).

3 Moran, A. E., Roth, G. A., Narula, J. & Mensah, G. A. 1990-2010 global cardiovascular disease atlas. *Global heart* **9**, 3-16, doi:10.1016/j.gheart.2014.03.1220 (2014).

4 Baigent, C. *et al.* Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* **366**, 1267-1278 (2005).

5 Moore, K. J. & Tabas, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* **145**, 341-355, doi:10.1016/j.cell.2011.04.005S0092-8674(11)00422-3 [pii] (2011).

6 Dixon, W. G. *et al.* Reduction in the incidence of myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis who respond to anti-tumor necrosis factor alpha therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Arthritis and rheumatism* **56**, 2905-2912, doi:10.1002/art.22809 (2007).

7 Gabriel, S. E. Cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis. *The American journal of medicine* **121**, S9-14, doi:10.1016/j.amjmed.2008.06.011 (2008).

8 Holmqvist, M. E. *et al.* No increased occurrence of ischemic heart disease prior to the onset of rheumatoid arthritis: results from two Swedish population-based rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis and rheumatism* **60**, 2861-2869, doi:10.1002/art.24855 (2009).

9 Prasad, M. *et al.* Cardiorheumatology: cardiac involvement in systemic rheumatic disease. *Nature reviews. Cardiology* **12**, 168-176, doi:10.1038/nrcardio.2014.206 (2015).

10 Shapiro, M. D. & Fazio, S. From Lipids to Inflammation: New Approaches to Reducing Atherosclerotic Risk. *Circulation research* **118**, 732-749, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306471 (2016).

11 Everett, B. M. *et al.* Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial: a test of the inflammatory hypothesis of atherothrombosis. *American heart journal* **166**, 199-207 e115, doi:10.1016/j.ahj.2013.03.018 (2013).

12 Ridker, P. M., Thuren, T., Zalewski, A. & Libby, P. Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *American heart journal* **162**, 597-605, doi:10.1016/j.ahj.2011.06.012 (2011).

13 Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *The New England journal of medicine*, doi:10.1056/NEJMoa1707914 (2017).

14 Ridker, P. M. *et al.* Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet*, doi:10.1016/S0140-6736(17)32814-3 (2017).

15 Berg, K. E. *et al.* Elevated CD14++CD16- monocytes predict cardiovascular events. *Circulation. Cardiovascular genetics* **5**, 122-131, doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.960385 (2012).

16 Qiu, M. K. *et al.* PD-1 and Tim-3 Pathways Regulate CD8+ T Cells Function in Atherosclerosis. *PloS one* **10**, e0128523, doi:10.1371/journal.pone.0128523 (2015).

17 Burke, A. P. *et al.* Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med* **336**, 1276-1282 (1997).

18 Moreno, P. R. *et al.* Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* **94**, 3090-3097 (1996).

19 Satija, R. & Shalek, A. K. Heterogeneity in immune responses: from populations to single cells. *Trends in immunology* **35**, 219-229, doi:10.1016/j.it.2014.03.004 (2014).

20 Papalexi, E. & Satija, R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. *Nature reviews. Immunology*, doi:10.1038/nri.2017.76 (2017).

21 Bendall, S. C. *et al.* Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science* **332**, 687-696, doi:10.1126/science.1198704 (2011).

22 Lavin, Y. *et al.* Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell* **169**, 750-765 e717, doi:10.1016/j.cell.2017.04.014 (2017).

23 Lai, L., Ong, R., Li, J. & Albani, S. A CD45-based barcoding approach to multiplex mass-cytometry (CyTOF). *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **87**, 369-374, doi:10.1002/cyto.a.22640 (2015).

24 Stary, H. C. *et al.* A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* **92**, 1355-1374 (1995).

25 Amir el, A. D. *et al.* viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nature biotechnology* **31**, 545-552, doi:10.1038/nbt.2594 (2013).

26 Levine, J. H. *et al.* Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis. *Cell* **162**, 184-197, doi:10.1016/j.cell.2015.05.047 (2015).

27 Moore, K. J., Sheedy, F. J. & Fisher, E. A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature reviews. Immunology* **13**, 709-721, doi:10.1038/nri3520 (2013).

28 Remark, R. *et al.* In-depth tissue analysis using multiplexed immunohistochemical consecutive staining on single slide. *Science Immunology* **1**, doi:10.1126/sciimmunol.aaf6925 (2016).

29 Bruggner, R. V., Bodenmiller, B., Dill, D. L., Tibshirani, R. J. & Nolan, G. P. Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E2770-2777, doi:10.1073/pnas.1408792111 (2014).

30 Pascual, V., Allantaz, F., Arce, E., Punaro, M. & Banchereau, J. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1479-1486, doi:10.1084/jem.20050473 (2005).

31 Kuleshov, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research*, doi:10.1093/nar/gkw377 (2016).

32 Lachmann, A. *et al.* ChEA: transcription factor regulation inferred from integrating genome-wide ChIP-X experiments. *Bioinformatics* **26**, 2438-2444, doi:10.1093/bioinformatics/btq466 (2010).

33 Mayr, B. & Montminy, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 599-609, doi:10.1038/35085068 (2001).

34 Nosrati, N., Kapoor, N. R. & Kumar, V. Combinatorial action of transcription factors orchestrates cell cycle-dependent expression of the ribosomal protein genes and ribosome biogenesis. *The FEBS journal* **281**, 2339-2352, doi:10.1111/febs.12786 (2014).

35 Laresgoiti, U. *et al.* E2F2 and CREB cooperatively regulate transcriptional activity of cell cycle genes. *Nucleic acids research* **41**, 10185-10198, doi:10.1093/nar/gkt821 (2013).

36 Wen, A. Y., Sakamoto, K. M. & Miller, L. S. The role of the transcription factor CREB in immune function. *Journal of immunology* **185**, 6413-6419, doi:10.4049/jimmunol.1001829 (2010).

37 Kaptoge, S. *et al.* Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. *European heart journal* **35**, 578-589, doi:10.1093/eurheartj/eht367 (2014).

38 Tacke, F. *et al.* Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation* **117**, 185-194, doi:10.1172/JCI28549 (2007).

39 Bottcher, J. P. *et al.* Functional classification of memory CD8(+) T cells by CX3CR1 expression. *Nature communications* **6**, 8306, doi:10.1038/ncomms9306 (2015).

40 Ait-Oufella, H., Taleb, S., Mallat, Z. & Tedgui, A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**, 969-979, doi:10.1161/ATVBAHA.110.207415 (2011).

41 Zernecke, A., Shagdarsuren, E. & Weber, C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**, 1897-1908, doi:10.1161/ATVBAHA.107.161174 (2008).

42 Kolodgie, F. D. *et al.* Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* **349**, 2316-2325, doi:10.1056/NEJMoa035655 (2003).

43 Erbel, C. *et al.* A human ex vivo atherosclerotic plaque model to study lesion biology. *Journal of visualized experiments : JoVE*, doi:10.3791/50542 (2014).

44 Combadiere, C., Ahuja, S. K., Tiffany, H. L. & Murphy, P. M. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES. *Journal of leukocyte biology* **60**, 147-152 (1996).

45 Murooka, T. T., Rahbar, R., Platanias, L. C. & Fish, E. N. CCL5-mediated T-cell chemotaxis involves the initiation of mRNA translation through mTOR/4E-BP1. *Blood* **111**, 4892-4901, doi:10.1182/blood-2007-11-125039 (2008).

46 Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G. & Hansson, G. K. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* **6**, 131-138 (1986).

47 Grivel, J. C. *et al.* Activation of T lymphocytes in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 2929-2937, doi:10.1161/ATVBAHA.111.237081 (2011).

48 Kolbus, D. *et al.* Association between CD8+ T-cell subsets and cardiovascular disease. *Journal of internal medicine* **274**, 41-51, doi:10.1111/joim.12038 (2013).

49 Braunersreuther, V. *et al.* A novel RANTES antagonist prevents progression of established atherosclerotic lesions in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**, 1090-1096, doi:10.1161/ATVBAHA.108.165423 (2008).

50 Liu, H. *et al.* Regulation of CCL5 expression in smooth muscle cells following arterial injury. *PloS one* **7**, e30873, doi:10.1371/journal.pone.0030873 (2012).

51 Potteaux, S. *et al.* Role of bone marrow-derived CC-chemokine receptor 5 in the development of atherosclerosis of low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**, 1858-1863, doi:10.1161/01.ATV.0000231527.22762.71 (2006).

52 Suffee, N. *et al.* RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis* **15**, 727-744, doi:10.1007/s10456-012-9285-x (2012).

53 Virani, S. S. *et al.* Relationship between circulating levels of RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed, and secreted) and carotid plaque characteristics: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Carotid MRI Study. *European heart journal* **32**, 459-468, doi:10.1093/eurheartj/ehq367 (2011).

54 Braunersreuther, V. *et al.* Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 373-379, doi:10.1161/01.ATV.0000253886.44609.ae (2007).

55 Li, J. *et al.* CCR5+T-bet+FoxP3+ Effector CD4 T Cells Drive Atherosclerosis. *Circulation research* **118**, 1540-1552, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308648 (2016).

56 Herder, C. *et al.* RANTES/CCL5 and risk for coronary events: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort, Athero-Express and CARDIoGRAM studies. *PloS one* **6**, e25734, doi:10.1371/journal.pone.0025734 (2011).

57 Tereshchenko, I. P. *et al.* CCL5/RANTES gene polymorphisms in Slavonic patients with myocardial infarction. *Mediators of inflammation* **2011**, 525691, doi:10.1155/2011/525691 (2011).

58 Ting, K. H. *et al.* Relationship of Genetic Polymorphisms of the Chemokine, CCL5, and Its Receptor, CCR5, with Coronary Artery Disease in Taiwan. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2015**, 851683, doi:10.1155/2015/851683 (2015).

59 Tavakkoly-Bazzaz, J. *et al.* RANTES gene mRNA expression and its -403 G/A promoter polymorphism in coronary artery disease. *Gene* **487**, 103-106, doi:10.1016/j.gene.2011.07.019 (2011).

60 Cavusoglu, E. *et al.* Low plasma RANTES levels are an independent predictor of cardiac mortality in patients referred for coronary angiography. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 929-935, doi:10.1161/01.ATV.0000258789.21585.76 (2007).

61 Zhang, Z. *et al.* CCR5 facilitates endothelial progenitor cell recruitment and promotes the stabilization of atherosclerotic plaques in ApoE-/- mice. *Stem cell research & therapy* **6**, 36, doi:10.1186/s13287-015-0026-0 (2015).

62 Bonanno, E., Mauriello, A., Partenzi, A., Anemona, L. & Spagnoli, L. G. Flow cytometry analysis of atherosclerotic plaque cells from human carotids: A validation study. *Cytometry* **39**, 158-165, doi:Doi 10.1002/(Sici)1097-0320(20000201)39:2<158::Aid-Cyto9>3.0.Co;2-8 (2000).

63 Fienberg, H. G., Simonds, E. F., Fantl, W. J., Nolan, G. P. & Bodenmiller, B. A platinum-based covalent viability reagent for single-cell mass cytometry. *Cytom Part A* **81A**, 467-475, doi:10.1002/cyto.a.22067 (2012).

64 Zunder, E. R. *et al.* Palladium-based mass tag cell barcoding with a doublet-filtering scheme and single-cell deconvolution algorithm. *Nat Protoc* **10**, 316-333, doi:10.1038/nprot.2015.020 (2015).

65 Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15-21, doi:10.1093/bioinformatics/bts635 (2013).

66 Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**, doi:Artn R106 10.1186/Gb-2010-11-10-R106 (2010).

67 Benjamini, Y., and Yosef Hochberg. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 289-300 (1995).

68 Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC bioinformatics* **14**, 128, doi:10.1186/1471-2105-14-128 (2013).

69 Johnson, W. E., Li, C. & Rabinovic, A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* **8**, 118-127, doi:10.1093/biostatistics/kxj037 (2007).

673 **FIGURE LEGENDS**

674 **Figure 1. Schematic flow of the multidimensional single-cell approach to study immune**
675 **variations across tissue. (A)** Atherosclerotic tissue and blood from patients undergoing carotid
676 endarterectomy (CEA) was processed to isolate immune cells and plasma. **(B)** Immune cells from
677 atherosclerotic tissue and blood were barcoded for paired single-cell CyTOF analysis. **(C)**
678 PhosphoCyTOF, gene expression (RNA-seq) and cytokine profiling were integrated to study
679 systemic and tissue-specific immune responses to plasma from CEA patients.

680 **Figure 2. Immune heterogeneity of human atherosclerotic tissue by paired single cell analyses.**
681 (**A)** viSNE plots of high-dimensional single-cell CyTOF data discriminate atherosclerotic tissue and
682 blood immune cells (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs). **(B)** Phenograph analysis
683 identified 24 distinct communities as visualized on the viSNE map. **(C)** Heat map illustrating
684 differential marker expression patterns to comprehensively identify major immune subsets across
685 identified clusters. (**D)** Overall immune composition of tissue and blood samples. **(E)** Regression
686 analysis of cell types at statistically different frequencies in tissue and blood across all samples
687 (n=15).

688 **Figure 3. Plasma of atherosclerotic patients drives innate immune responses in blood**
689 **immune cells.** (**A**) viSNE plot of blood immune cells (PBMCs) show major immune cell subsets
690 defined based on canonical expression markers. **(B)** Single-cell signaling patterns were visualized
691 across this immune map in response to autologous atherosclerotic (n=9) or pooled healthy plasma
692 (n=5 donors). Dot plots show the effect of autologous plasma on the phosphorylation of
693 intracellular kinases in $CD14^+$ monocytes and $CD1c^+$ DCs across 9 patients. Data were analyzed
694 using paired t-test. **(C)** Bi-clustered heatmap of filtered cell-type: phosphoprotein data
695 (FDR<10%) show significant immune responses (Log_2 FC, auto/healthy) to autologous vs. healthy
696 plasma. (**D**) $CD14^+$ monocyte and $CD1c^+$ dendritic cells (DCs) are the most responsive cell, as
697 shown by the number of phosphoprotein activated by atherosclerotic plasma. FC: fold-change.

Figure 4. Multiplexed intracellular signaling single cell and gene expression analyses mark the immune response to plasma of atherosclerotic patients. (**A**). viSNE plot of major blood immune cell subsets were defined based on canonical expression patterns. **(B)** Heatmap summary of CyTOF data, ordered by stimulatory plasma condition and similarity of the most plasma-sensitive cell types, $CD14^+$ and $CD16^+$ monocytes and $CD1c^+$ dendritic cells, highlights the activation of specific intracellular markers in each cell type in response to atherosclerosis plasma (n=20) or healthy donor plasma (n=10). **(C)** Principal component analysis (PCA) of RNA-seq and corresponding CyTOF data aggregated by cell type. **(D)** Heat map of DEGs (DESeq, Benjamini-Hocheberg, $p<0.05$) showing z-score of transcripts with absolute $\log_2$ fold change >1.2 and normalized sequence counts >4. **(E)** Log_2 fold-change distribution of 4,823 differentially expressed genes (DEGs) in response to atherosclerotic (n=10) vs. healthy donor (n=6) plasma. Significant DEGs are shown in red. Enriched GO biological processes of the significant up- and down-regulated genes are shown on the right and ordered based on Enrichr's rank-based statistic.

Figure 5. Filtered cross-correlations of RNA-seq and aggregate single cell data pinpoints regulatory relationships between cell type-specific signaling pathways and gene expression profile. (**A**) Enriched GO terms from gene expression data. (**B**) Hierarchically ordered heatmap of Pearson's correlations between gene expression and phosphoprotein-cell type pairs. Only DEGs belonging to the enriched GO terms are included. (**C**) Pairs of phosphoprotein and cell-type with the highest median cross-correlation with RNA-seq data.

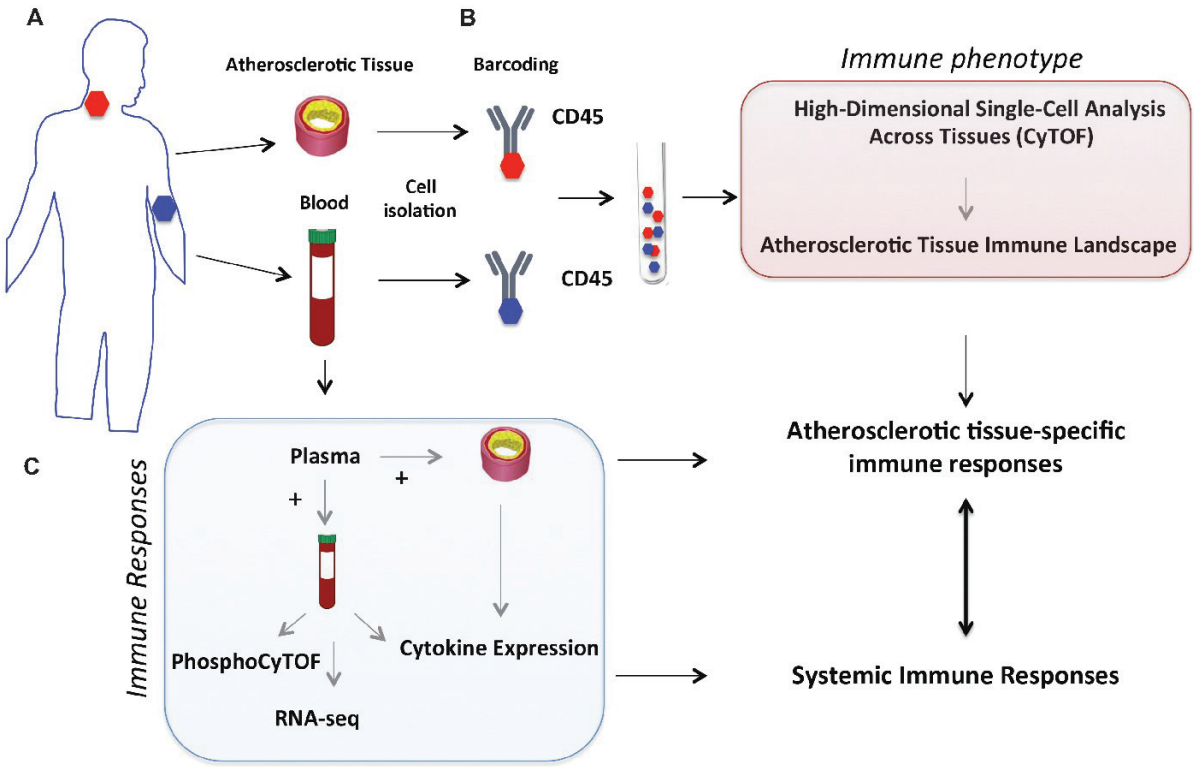
Figure 6. Phospho-CyTOF screening of plasma candidate cytokines.

(A) Identification and validation of candidate cytokine(s) responsible for the immune response of PMBCs to CEA plasma. **(B)** Heat map of differentially expressed (DEs) cytokine identified in plasma of CEA patients and healthy donors. Dot plots of the top five plasma cytokines with clustering based on standardized values (z-scores). (**C**) Effect of candidate plasma cytokines on the phosphorylation of intracellular kinases in healthy PMBCs using mass cytometry. HD, healthy

723 donor; Combo, cocktail of candidate cytokines. (**D**) Spearman correlation of CCL5 levels in plasma
724 of CEA and healthy donor plasma with intracellular signal intensity of pS6, pERK1/2 and pp38
725 phosphorylation in monocytes. **(E)** viSNE plots of a representative sample show the effect of CCL5
726 inhibition using a blocking antibody on the phosphorylation of intracellular kinases activated by
727 atherosclerotic plasma. Dot plots show the effect of CCL5 inhibition on the phosphorylation of
728 intracellular kinases in $CD14^+$ monocytes across 8 patients. Data were analyzed by paired two-tailed
729 t-test statistics. *P<0.0001; **P=0.002

730 **Figure 7. Tissue-specific adaptive immune responses in atherosclerosis. (A)** Schematic of the
731 experimental design to study tissue-specific functional immune responses. **(B)** Plots show cytokines
732 secreted by atherosclerotic tissue following perturbation with atherosclerotic autologous plasma
733 (n=5). **(C)** Heat map of secreted cytokines differentially in atherosclerotic tissue vs. blood immune
734 cells treated with atherosclerotic plasma of the same patients. FC: fold-change. **(D)** Contour plots of
735 T cell subsets expressing CCR5 in atherosclerotic tissue-associated and blood immune cells of
736 patients atherosclerotic cardiovascular disease. **(E)** Dot plots show the frequencies of $CCR5^+CD4^+$,
737 $CCR5^+CD8^+$ and $CCR5^+CD127$low $CD8^+$ T cells in each T cell subset present in atherosclerotic
738 tissue and blood immune cells of the same patient (n=10) and the enrichment of $CCR5^+$ of the same
739 subsets of T cells in tissue, calculated as the ratio of the median intensity. P-values were calculated
740 by paired two-tailed t-test statistics or ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis as appropriate.
741

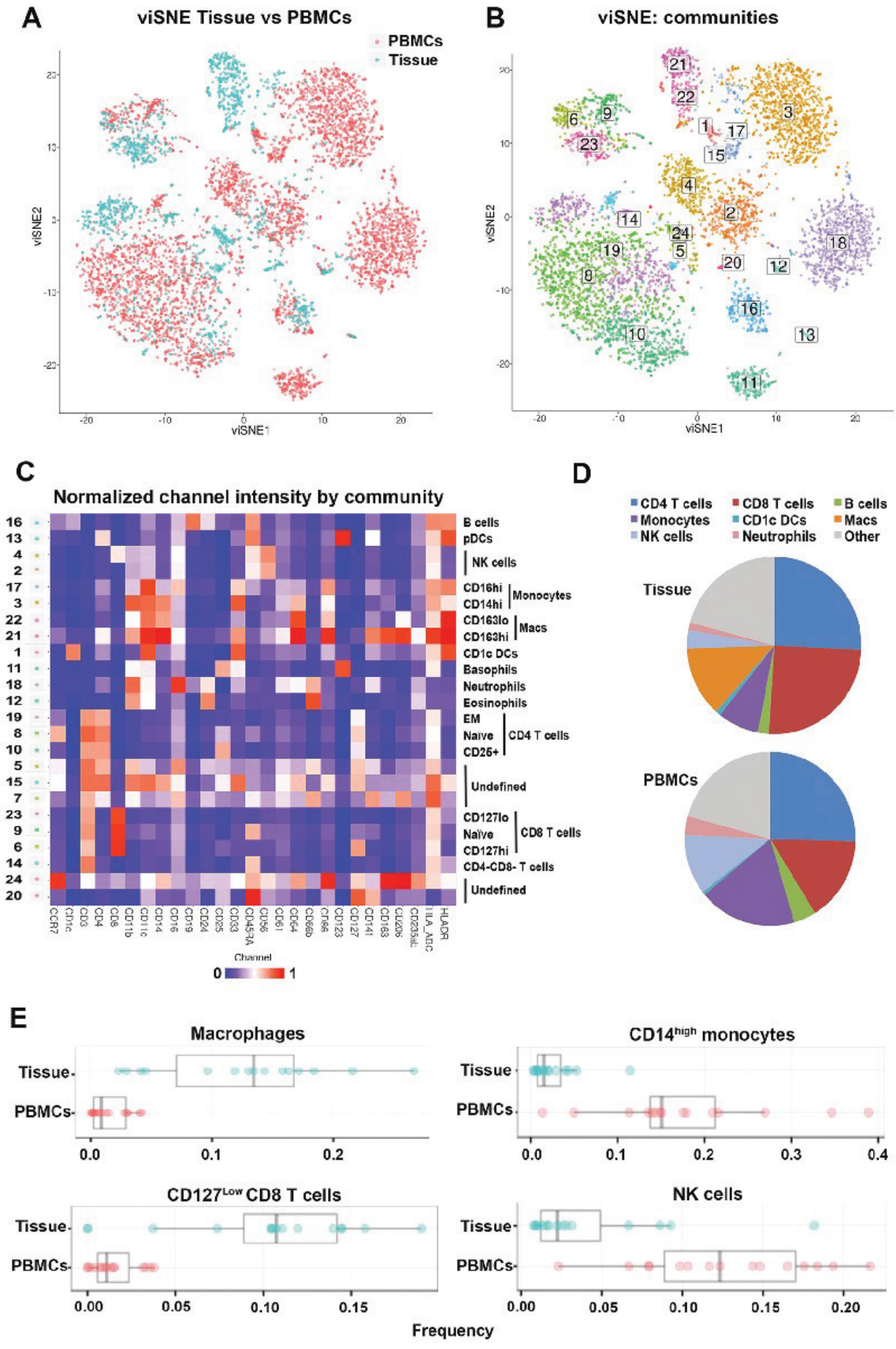
742 Figure 1.



743

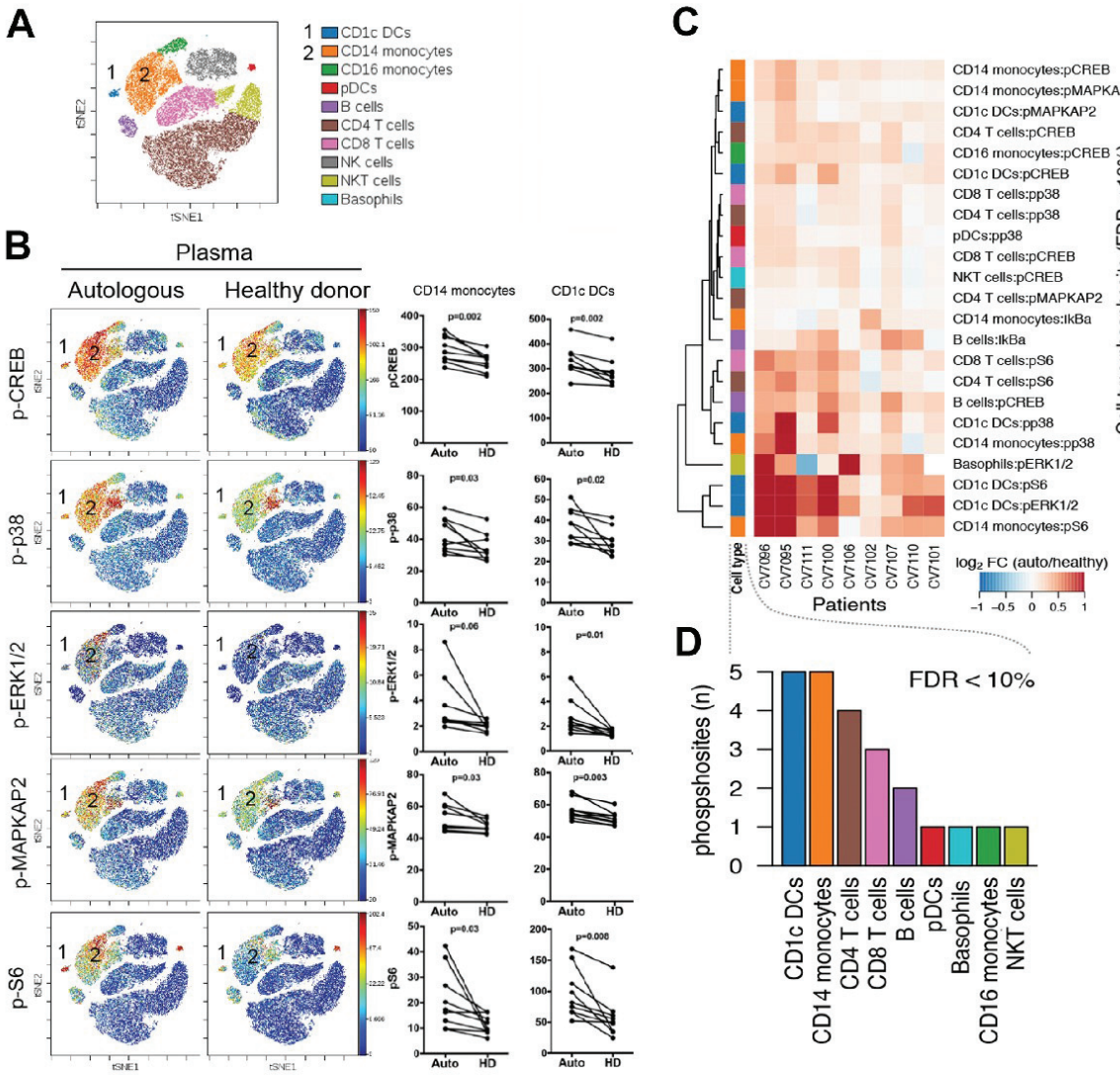
744

745 Figure 2.



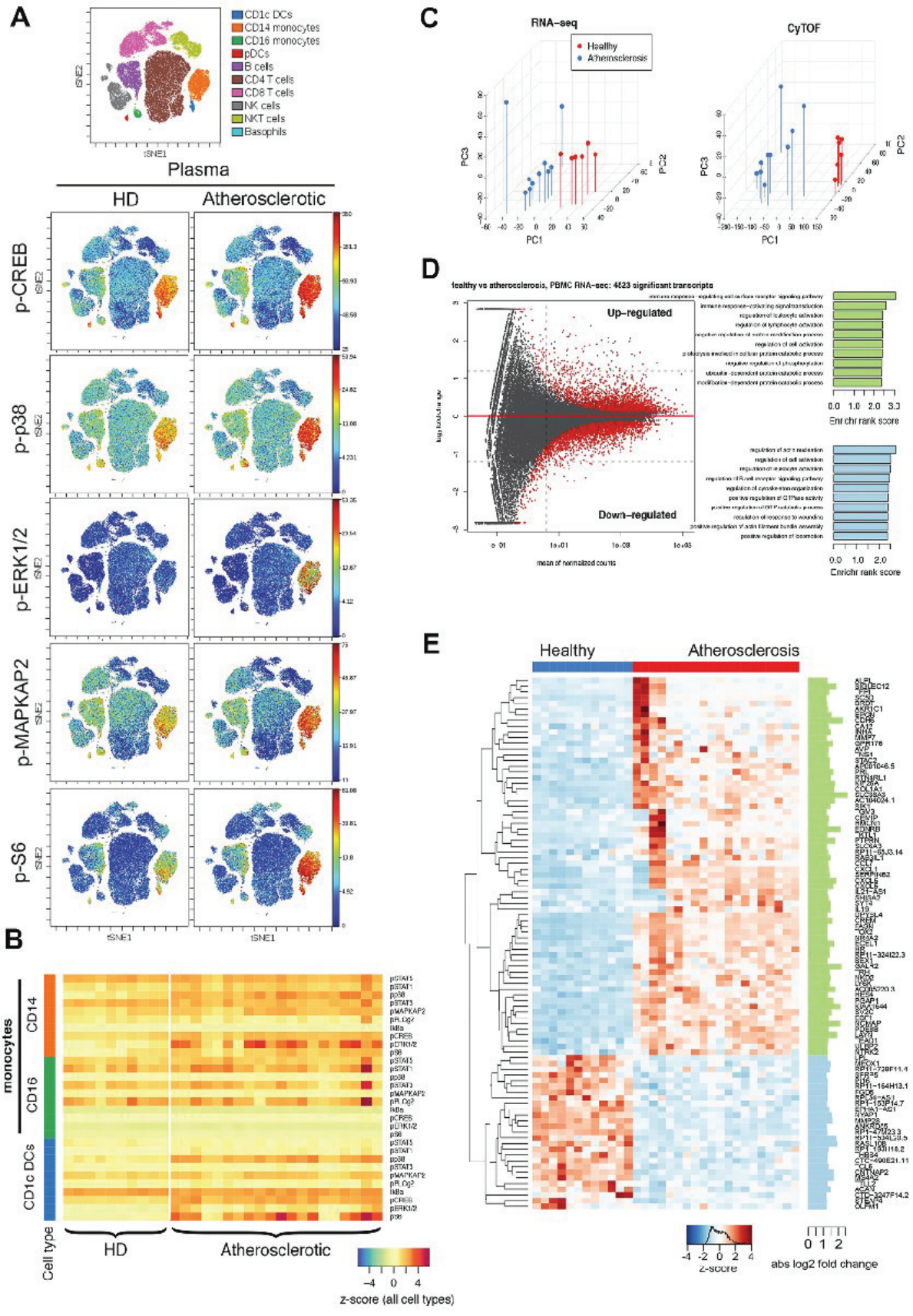
746

747 Figure 3.



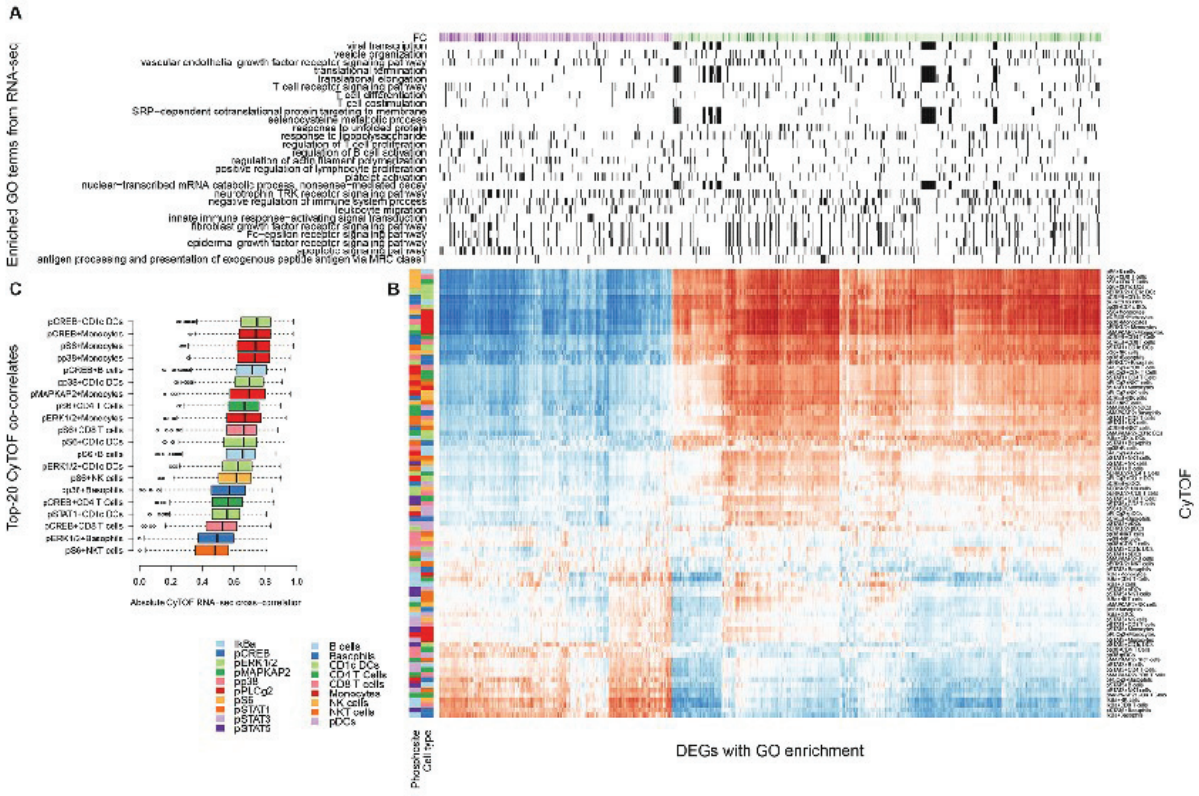
748

749 Figure 4.



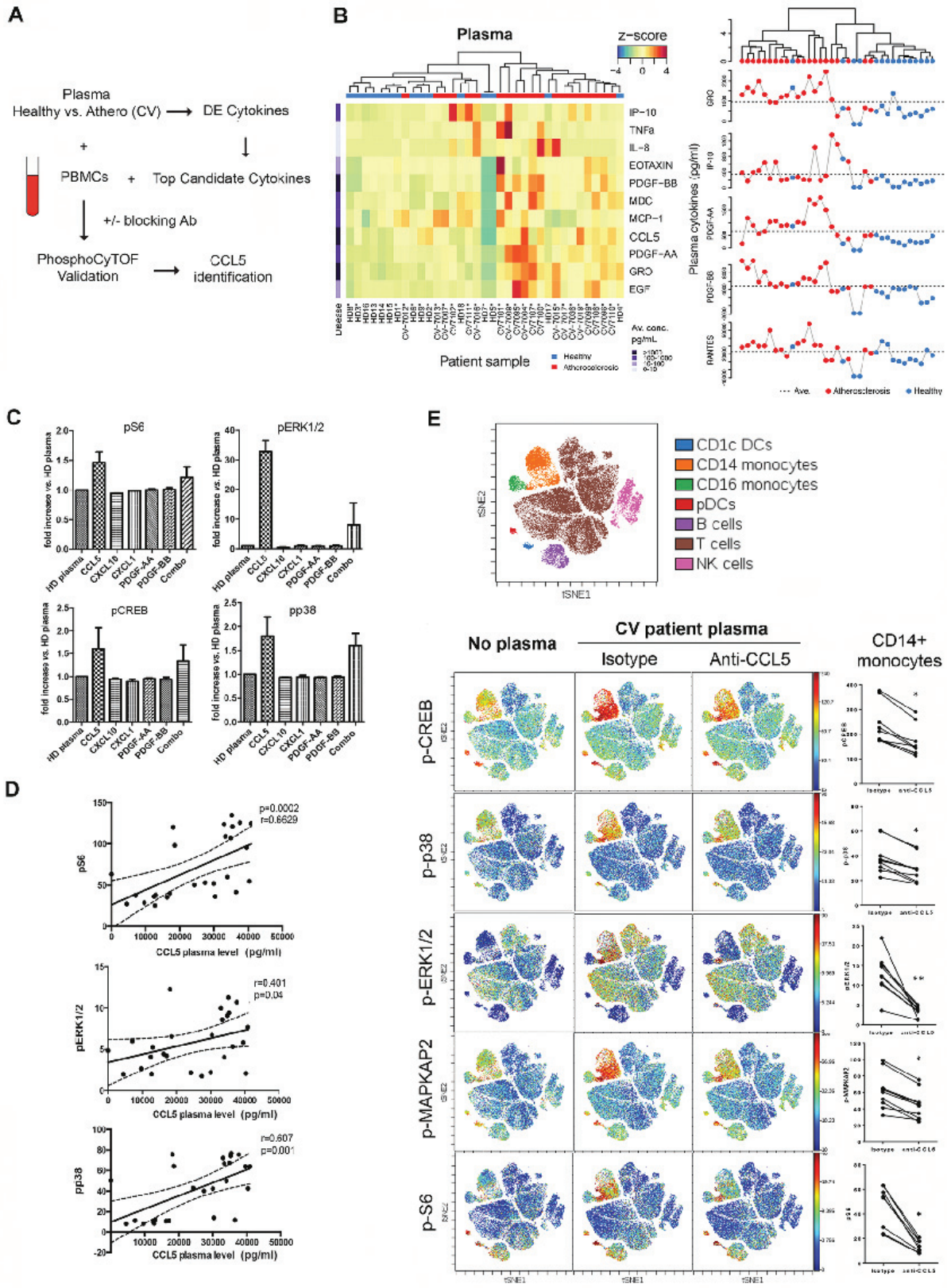
750

751 Figure 5.



752

753 Figure 6.

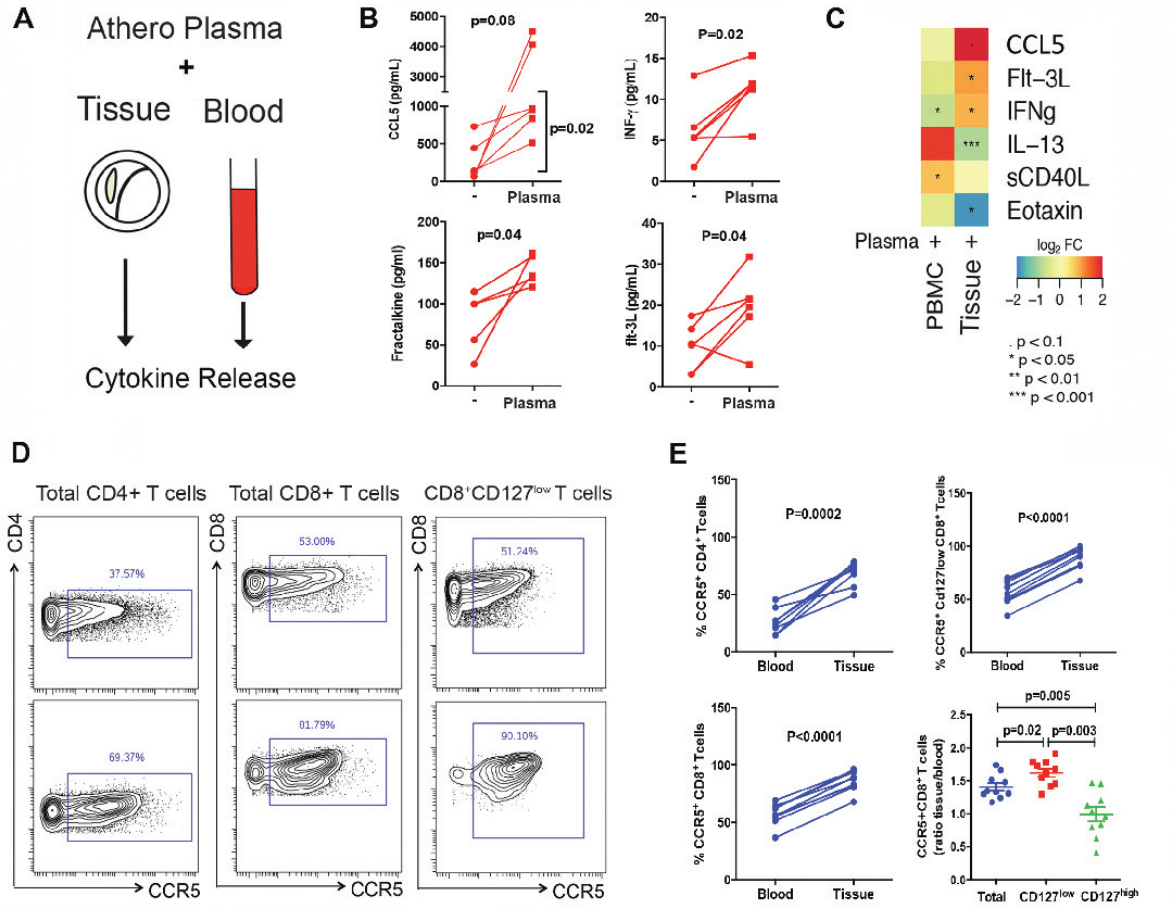


754

755

756

757 Figure 7.



758

759

ÉTUDE 3 : EFFETS DE L'ACTIVITE PHYSIQUE ET DE LA SEDENTARITE SUR LE PHENOTYPE PRO- OU ANTI-INFLAMMATOIRE DES MONOCYTES CIRCULANTS CHEZ LE PATIENT A RISQUE D'AVC

Mury P, Weiss-Gayet M, Mura M, Millon A, Chazaud B, Pialoux V.

En préparation

L'étude 2 nous apporte les preuves de l'implication de l'inflammation et de l'immunité innée dans la progression de la plaque d'athérosclérose, en particulier par l'intermédiaire de l'axe CCL5/CCR5 sur les monocytes. En effet, l'activation des protéines était plus significative par les monocytes par rapport aux autres types cellulaires (lymphocytes B, lymphocytes T, cellules dendritiques, natural killer, etc). Nous avons aussi vu dans l'étude 1 que l'activité physique et la sédentarité avaient tendance à moduler l'accumulation de macrophages dans la plaque. Les résultats de ces 2 précédentes études soulignent l'intérêt de s'intéresser à l'impact de l'activité physique et la sédentarité sur le phénotype des monocytes. En effet, comme expliqué dans le chapitre 1 de ce manuscrit, les premières étapes de l'athérogénèse résultent dans l'infiltration de monocytes circulants dans la paroi artérielle, entrainant leur différenciation en macrophages puis la formation de cellules spumeuses. Il a été montré dans la littérature que la formation de cellules spumeuses était lié à un phénotype pro-inflammatoire (Dushkin 2012). Il est alors envisageable que les monocytes circulants infiltrés dans l'intima présentent un phénotype pro-inflammatoire entrainant leur différenciation en macrophages pro-inflammatoire M1. L'objectif de cette 3ème étude est alors d'évaluer les effets de l'activité physique et de la sédentarité sur le phénotype des monocytes chez le patient à risque d'AVC, et ainsi caractériser les réponses fonctionnelles de cellules immunitaires périphériques en fonction des niveaux d'activité physique et de sédentarité.

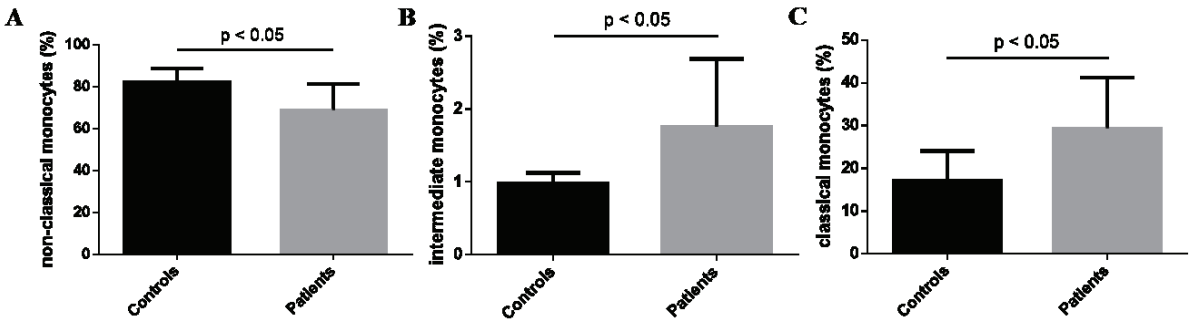
Cette étude a été finalisée dans le cadre d'une allocation de fin de thèse de 6 mois accordée par la Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA).

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet du plasma de patients à la fois très sédentaires et inactifs ainsi que des patients très actifs et peu sédentaires de notre cohorte de patients asymptomatiques (étude 1) sur le phénotype des monocytes circulants. Pour cela, nous avons stimulé des monocytes sains avec le plasma de ces patients et analysé le phénotype des monocytes par cytométrie en flux. Le phénotype des monocytes a été

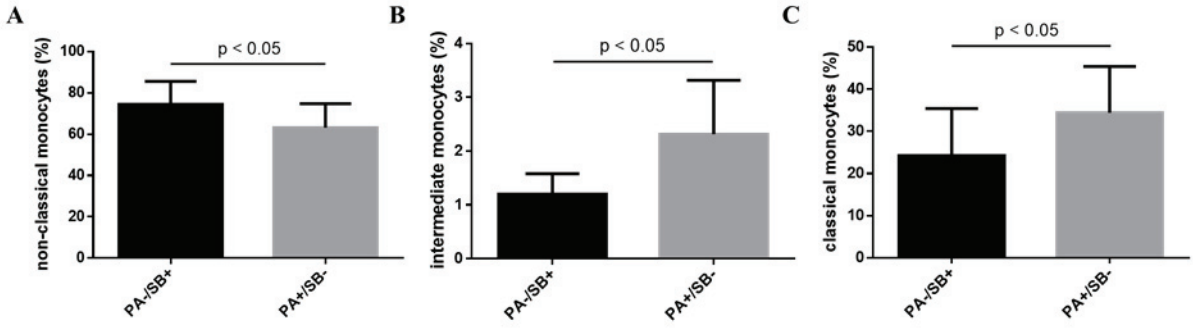
déterminé à l'aide de marquages de CD14 et CD16 par cytométrie en flux. Trois principales sous-populations de monocytes ont été identifié dans la littérature (Wong et al. 2012) : les monocytes classiques ($CD14^{++}CD16^{-}$), les monocytes intermédiaires ($CD14^{++}CD16^{+}$) et les monocytes non classiques ($CD14^{+}CD16^{++}$). Dans le même temps, nous avons évalué la production de chimiokines par multiplex dans 2 conditions : dans le plasma de ces mêmes patients et lorsque des monocytes sains étaient stimulés par du plasma de patients, afin de déterminer i) quelles chimiokines plasmatiques pourraient favoriser la modulation du phénotype des monocytes circulants et ii) quels facteurs sont relargués par les monocytes en fonction de leur phénotype. Lors de la troisième étape, nous avons testé l'effet des 3 chimiokines les plus modulées (positivement ou négativement) par l'AP sur le phénotype de monocytes sains. Parmi les 3 chimiokines identifiées, nous en avons identifié une qui modulait particulièrement le phénotype des monocytes sains. Enfin, l'objectif de la 4ème étape est de démontrer l'effet de cette chimiokine sur la polarisation des monocytes circulants dans le plasma de patients très actifs et très sédentaires de notre cohorte.

Les principaux résultats de cette 3ème étude préliminaire montrent l'implication de la chimiokine GM-CSF, négativement associée au niveau d'activité physique, dans la modulation de la polarisation des monocytes circulants. En effet, nous avons observé une différence de phénotype des monocytes lorsqu'ils étaient stimulés 24h par du plasma de patients par rapport au plasma des sujets contrôles. En particulier, le pourcentage des monocytes non classiques ($CD14^{+}CD16^{++}$) est diminué quand ces monocytes sont stimulés avec du plasma de patients alors que le pourcentage des monocytes intermédiaires ($CD14^{++}CD16^{+}$) et classiques ($CD14^{++}CD16^{-}$) est augmenté (Figure 1 de l'article). Ces données de stimulation de monocytes sains par du plasma confirment des données de la littérature sur le profil des monocytes circulants de patients avec plaques d'athérome comparés à des sujet sains montrant une diminution des monocytes non classiques et une augmentation des monocytes intermédiaires et classiques (Rogacev et

al. 2012). Ce résultat suggère aussi que des facteurs plasmatiques seraient impliqués dans la modulation du phénotype des monocytes des patients.



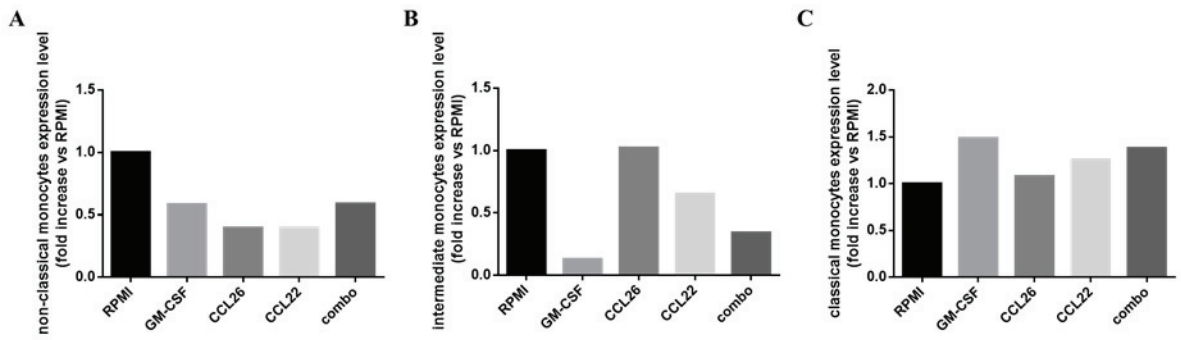
Nous avons aussi observé des différences de phénotype des 3 sous-populations de monocytes en fonction des niveaux d'AP et de sédentarité de nos patients (diminution du pourcentage des monocytes non classiques et augmentation du pourcentage des monocytes intermédiaires et classiques ; Figure 2 de l'article), suggérant une potentielle implication de l'AP dans l'expression de facteurs plasmatiques à l'origine de la modulation du phénotype des monocytes.



Ensuite, nous avons mesuré l'expression d'un panel de 40 chimiokines dans le plasma des mêmes patients et sujets contrôles, afin de comprendre si les différentes réponses monocytaires (suite à leur stimulation par du plasma de patients) que nous avons observées au cours de la 1ère étape, pourraient être expliquées par une différence d'expression de chimiokines comme précédemment suggéré. Ainsi, nous avons

sélectionné 3 chimiokines différemment exprimées chez les patients les plus actifs et les patients les plus sédentaires (GM-CSF, CCL22 et CCL26) (Table 2 de l'article).

Lors de la 3ème étape, nous avons évalué l'effet de ces 3 chimiokines (à différentes doses équivalentes à 1X, 10X et 100X des concentrations respectives mesurées par multiplex dans les plasmas des patients) sur le phénotype de monocytes sains, ainsi qu'une combinaison des 3 chimiokines, afin de mimer l'environnement plasmatique de nos patients. Ainsi, nous avons pu observer que la chimiokine GM-CSF permettait une forte diminution du pourcentage des monocytes intermédiaires $CD14^{++}CD16^{+}$ (par un facteur 8) ainsi qu'une augmentation du pourcentage des monocytes classiques $CD14^{++}CD16^{-}$ (par un facteur 1,5) (Figure 3 de l'article).



La prochaine étape est d'inhiber *in vitro* GM-CSF et CCL22 (avec des anticorps bloquants anti-GM-CSF et anti-CCL22 humains, R&D systems, Abingdon, UK) sur la polarisation de ces monocytes. Dans le même temps, nous testerons la capacité phagocytique des monocytes en mesurant l'ingestion de LDL oxydés humains (Dil oxidized-LDL from human plasma, Invitrogen, Oregon, USA). Enfin, nous prévoyons d''incuber des monocytes circulants de patients sédentaires dans du plasma autologue où GM-CSF et/ou CCL22 auront été inhibés.

En l'état, nos résultats suggèrent que :

1. La chimiokine GM-CSF, et dans une moindre mesure CCL22, permettraient de moduler le phénotype des monocytes, en particulier en diminuant le pourcentage des monocytes intermédiaires $CD14^{++}CD16^{+}$ (connus pour avoir un fort potentiel pro-inflammatoire; Zawada et al. 2011).
2. Dans le contexte de l'athérosclérose carotidienne, les niveaux d'activité physique permettent une modulation de la composition plasmatique influant sur le phénotype des monocytes, en particulier une diminution du pourcentage des monocytes non classiques (connus pour être impliqués dans la surveillance tissulaire ; Cros et al. 2010) ainsi qu'une augmentation du pourcentage des monocytes intermédiaires (pouvoir pro-inflammatoire, Zawada et al. 2011) et classiques (pouvoir phagocytaire, Zawada et al. 2011).
3. Le niveau d'activité physique est associé à une diminution de l'expression plasmatique de la chimiokine GM-CSF.

Ainsi, les niveaux d'activité physique et de sédentarité de nos patients asymptomatiques à risque d'AVC pourraient être associés à une modulation du phénotype des monocytes circulants par l'intermédiaire de la diminution de l'expression de la chimiokine GM-CSF. Néanmoins, nous devons confirmer cette hypothèse en inhibant la chimiokine GM-CSF dans le plasma de nos patients et évaluer le phénotype des monocytes afin de tirer des conclusions physiologiques de ces résultats préliminaires.

Title: Effects of physical activity and sedentary behavior on monocytes polarization of asymptomatic carotid atherosclerotic plaque

Short title: Physical activity on monocytes polarization

Pauline Mury[1,2], Michèle Weiss-Gayet[3], Mathilde Mura[1,2], Rémi Mounier[3], Antoine Millon[4,5], Bénédicte Chazaud[3*], Vincent Pialoux[1,2,6*]

[*]These authors equally supervised this work.

[1]Interuniversity Laboratory of Human Movement Biology EA7424, Vascular biology and Red Blood Cell team, University Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France
[2] Laboratory of Excellence GR-Ex, Paris, France
[3]Institut NeuroMyoGène, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM U1217, CNRS UMR5310, Lyon, France
[4]Department of Vascular Surgery, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France
[5] CarMeN Laboratory, INSERM U1060, University Claude Bernard Lyon 1, Bron, France.
[6] Institut Universitaire de France, Paris, France

Introduction

Atherosclerosis is a complex cardiovascular disease, recognized as a chronic inflammatory disease of the arterial wall, leading to atherosclerotic plaque formation (Redgrave et al. 2008). In response to lipid accumulation into the arterial wall and their oxidation, endothelial cells are activated, and peripheral blood monocytes are recruited to damaged sites (Geissmann et al. 2003). After adherence to the endothelium, monocytes infiltrate the intima, differentiate into macrophages, and ingest oxidized-lipids becoming foam cells (Libby and Hansson 1991). Foam cells accumulation form fatty streaks that subsequently develop into atheroma (Idzkowska et al. 2015).

Three monocyte subsets are currently identified, with distinct phenotypic and functional properties: classical monocytes ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediate monocytes ($CD14^{++}CD16^{+}$) and non-classical monocytes ($CD14^{+}CD16^{++}$) (Ziegler-Heitbrock et al. 2010; Wong et al. 2011). In a general context, $CD16^{+}$ monocytes were known as “pro-inflammatory” monocytes since they produce high amounts of TNF-α and IL-1β (Belge et al. 2002) and their accentuated increase in inflammatory conditions (Grip et al. 2007). Actually, it appears that intermediate monocytes showed a high inflammatory potential (by producing high amount of reactive oxygen species in basal conditions as well as IL-1β and TNF-α after LPS stimulation) (Zawada et al. 2011) while non-classical monocytes are involved in innate local surveillance of tissues (i.e. patrolling the endothelium of blood vessel, by expressing a broad range of adhesion molecules) (Cros et al. 2010). Inversely, classical monocytes exhibited a high phagocytosis potential (by expressing a broad range of genes linked to phagocytosis and showing an important phagocytic capacity) (Zawada et al. 2011; Idzkowska et al. 2015).

Interestingly, only few studies have focused on the heterogeneity of the three monocytes subsets in human atherosclerosis, most of previous studies considering intermediate and non-classical monocytes as a single population. Among them, Berg et al. (2012) first showed that classical $CD14^{++}CD16^{-}$ monocytes were predictive of ischemic cardiovascular events, supplying inflammation and weakening the plaque fibrous cap. However, the results of this study were based

on frozen mononuclear cells response, and thus need to be consider with caution. In the largest prospective cohort study (n = 951) on monocyte heterogeneity, Rogacev et al. (2012) demonstrated that intermediate $CD14^{++}CD16^{+}$ monocytes were independent predictors of adverse cardiovascular events. Moreover, they showed that primary endpoints such as acute myocardial infarction or non-hemorrhagic stroke were associated with higher counts of total monocytes, intermediate $CD14^{++}CD16^{+}$ and classical $CD14^{++}CD16^{-}$ monocytes, but not with non-classical $CD14^{+}CD16^{++}$ monocytes. However, none of these studies investigated whether immune responses were due to intrinsic factors of monocytes or plasmatic environmental features. Finally, it was proposed in atherosclerosis that chemokine regulation may modulate monocyte phenotype and are likely involved in development and progression of atherosclerotic plaque (Barlic and Murphy 2007).

Regular physical activity (PA) is known to have beneficial effects on atherosclerosis, particularly in preventing adverse cardiovascular events (Sofi et al. 2008) and reducing the incidence of carotid artery disease (Stein et al. 2015). Regarding the association between PA and monocyte characteristics, it has been first demonstrated that acute PA led to mobilization of $CD16^{+}$ monocytes from the marginal pool to lesion site, in a catecholamine-dependent way (Steppich et al. 2000). This result was confirmed more recently, with an percentage increase in intermediate $CD14^{++}CD16^{+}$ and non-classical $CD14^{+}CD16^{++}$ monocytes post-acute exercise (Hong and Mills 2008; Van Craenenbroeck et al. 2014). In these studies, a percentage decrease in classical $CD14^{++}CD16^{-}$ monocytes was also observed, suggesting different responses to acute PA among monocyte subsets and a greater mobilization response of the $CD16^{+}$ monocytes. Nevertheless, none of these studies investigated the mobilization response to a regular physical activity. Moreover, it was widely demonstrated that PA modulate cytokine and chemokine expressions in the plasma (Pinto et al. 2012). Since chemokines may modulate monocytic responses in the context of atherosclerosis (Barlic and Murphy 2007), it can be hypothesized that these monocyte phenotype regulations induced by PA could result partially from plasmatic chemokine regulation. The aim of this study was therefore (i) to evaluate the effects of plasmatic cytokines and chemokines features of physically

active vs. sedentary asymptomatic patients at high-risk of stroke, who underwent carotid endarterectomy, on monocyte subsets distribution and (ii) by combining fluorescence-activated cell sorting and multiplexed cytokine arrays to identify potential plasmatic chemokine(s) that may be involved on the effect of physical activity on the monocyte subsets of these patients.

Methods

Patients

Sixteen asymptomatic patients (i.e. with no clinical history of stroke or transient ischemic attack within the past 6 months) undergoing carotid endarterectomy (CEA) were included in this study. All patients were being treated with statins, platelet antiaggregants, and angiotensin converting enzyme inhibitors (Haute Autorité de Santé 2015). Written informed consent for the analysis of biological samples and questionnaires were obtained from all patients. This study was approved by the "Hospices Civils de Lyon — CPP Est". The main cardiovascular risk factors, including hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, smoking status, and body mass index (BMI), were recorded. Venous blood samples were drawn from the cephalic vein in tubes containing ethylenediamine tetraacetic acid before surgery.

Questionnaires

All patients responded to three questionnaires by phone within a week and at least 48 hours after the surgery. The Mini Mental State Examination (MMSE) questionnaire was used to confirm their mental health after the surgery. When the MMSE was adequate (i.e. score > 27)(Crum et al. 1993), PA and intensity level were measured according to the Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ) and analyzed per the Analysis Guide provided by the WHO. SB time was measured with the Sedentary Behavior Questionnaire (Rosenberg et al. 2010). PA time was expressed in min/day, and sedentary time was expressed in hours/day.

Plasma and Monocytes Isolation from Blood

Blood of atherosclerotic patients was processed within 1 hour of collection and spun down at 1500rpm for 10 minutes at 4°C. Plasma of atherosclerotic patients was immediately stored at -80°C. Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) were isolated from buffy coat of healthy donors (purchased from Etablissement Français du Sang). Cell fraction was diluted in Phosphate Buffered Saline (PBS) (ratio 1:5). Diluted blood suspension was overlaid over the top of Ficoll-Paque Plus (ratio 7:3) (GE Healthcare Life Sciences) and centrifuged for 20 minutes at 2000 rpm at room temperature. After centrifugation the PBMC layer was collected and washed in PBS. PBMC were pelleted down by low speed centrifugation (300g) and resuspended in RPMI-1640 medium (Gibco, MD, USA) containing 2% human serum AB (BioWest, France), diluted at $6x10^6$ cells/ml. Healthy PBMC were plated in 12-wells plate and incubated at 37° for 1 hour for monocytes isolation. Monocytes were isolated by adhesion to polystyrene cell culture plates for 1 hour. Adherent monocytes were washed in PBS for immediate stimulation.

Stimulation of monocytes with atherosclerotic plasma and phenotypic characterization by flow cytometry

Healthy monocytes were stimulated by 20% of atherosclerotic plasma and incubated at 37°C, 5% CO2 for 24 hours. Stimulation was stopped by removing the supernatant and monocytes were labeled with cell surface anti-CD14-FITC (BD Biosciences, CA, USA) and anti-CD16-PE (BD Biosciences, CA, USA) antibodies to characterize monocyte subsets using FACS Canto II cell sorter and DIVA software (BD Biosciences).

Measurement of Multiplex Biomarkers

Culture supernatant and plasma chemokines were measured using a commercially available human chemokine magnetic bead panel (Bio-Plex Pro™ Human Chemokine Panel, 40-Plex #171AK99MR2, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) as per the manufacturer's instructions on Luminex BioPlex-100 multiplex immunoassay system. Data were analyzed using Bio-Plex Manager™ Standard Software (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Chemokine expression into the

plasma was used to select the top-five differentially expressed. Chemokine expression by monocytes was calculated by normalizing each chemokine value in the supernatant for the concentration of each corresponding chemokine in plasma as follow: net-release (pg/ml) = supernatant concentration (pg/ml) – 20% plasma concentration (pg/ml).

Stimulation of monocytes with differentially expressed chemokines and phenotypic characterization by flow cytometry

Healthy monocytes were stimulated by the three selected differentially expressed chemokines (10X concentration was chosen after a dose-response analysis: 1X, 10X and 100X) and incubated at 37°C, 5% CO2 for 24 hours (GM-CSF, CCL26, CCL22 from R&D systems, Abingdon, UK). Stimulation was stopped by removing the supernatant and monocytes were labeled with cell surface anti-CD14-FITC (BD Biosciences, CA, USA) and anti-CD16-PE (BD Biosciences, CA, USA) antibodies to characterize monocyte subsets using FACS Canto II cell sorter and DIVA software (BD Biosciences).

Biological parameters

Total cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol concentrations were determined using a biochemistry automat analyzer (Abbott architect, Abbott Diagnostics, CA, USA). Platelet count was determined using a hematology analyzer (Coulter LH 750, Beckman Coulter, CA, USA). Plasma fibrinogen was measured by the Clauss method using an ACL Top automatizer (Werfen, Barcelona, Spain). The Clauss method determines a thrombin time based on optical detection of fibrin formation against a standard curve from referent plasma.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SD. Comparisons of monocyte subsets percent and chemokine concentrations were first made between patients and healthy controls, using a non-parametric Mann-Whitney test. Then, all the PA and SB level data were ranked in increasing order. The population of

16 patients was divided into 2 groups (n=8 per group) of both PA and SB levels. PA-/SB+ group corresponded to the simultaneously least physically active and most sedentary patients and PA^{+}/SB^{-} to the simultaneously most physically active and least sedentary patients. The percent of the three different monocyte subsets, such as the chemokine concentrations, was compared among these two groups using a non-parametric Mann-Whitney test.

Results

PA and SB levels

The total population was divided according to mixed criteria: patients with both the lowest PA level and the highest SB level (n=8; PA-/SB+: 7.05 ± 5.46 min/day and 9.80 ± 2.04 h/day for PA and SB, respectively) and patients with both the highest PA level and the lowest SB level (n=8; PA+/SB-: 98.04 ± 42.04 min/day and 4.68 ± 1.27 h/day for PA and SB, respectively).

Cardiovascular risk factors characteristics

Neither age, nor biological parameters (total cholesterol, triglycerides, HDL-C, LDL-C, platelets, glucose, fibrinogen) or the different cardiovascular risk factors (hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, smoking, BMI) differed between the 2 groups of PA levels (Table 1).

Table 1. *Cardiovascular risk factors and biological characteristics of the PA level groups*

	PA-/SB+	PA+/SB-	References
n	8	8	
Age (years)	72,3 ± 8,1	68,9 ± 8,5	
Hypertension	4 (50,0%)	7 (87,5%)	
Dyslipidemia	5 (62,5%)	2 (25,0%)	
Diabetes mellitus	3 (37,5%)	5 (62,5%)	
Smoking			
Active	1 (12,5%)	1 (12,5%)	
Detoxed	6 (75,0%)	6 (75,0%)	
pack-year	32,7 ± 24,4	27,9 ± 16,6	
BMI	25,8 ± 2,2	25,3 ± 3,1	
Percent stenosis	70,0 ± 21,2	70,0 ± 10,8	
AHA classification			
Lovett classification			
Total cholesterol (mmol/l)	4,56 ± 0,43	4,32 ± 0,14	3.5 – 7.0
Triglycerides (mmol/l)	1,58 ± 0,27	1,02 ± 0,07	0.4 – 1.7
HDL-C (g/l)	1,13 ± 0,21	1,30 ± 0,02	> 1.0
LDL-C (mmol/l)	2,72 ± 0,51	2,56 ± 0,09	1.9 – 4.1
Platelets (10^{-9}/l)	222,0 ± 23,1	213,4 ± 19,9	150 - 400
Glucose (mmol/l)	7,71 ± 1,14	8,34 ± 1,09	4.1 – 5.8
Fibrinogen (g/l)	3,84 ± 0,38	3,50 ± 0,32	2.4 – 5.0

Values are expressed as mean ± SD and percent within the group. AHA, American Heart Association; BMI, body mass index; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol.

Atherosclerotic plasma effect on systemic monocyte polarization

To analyze the potential effect of plasmatic factors on systemic monocyte polarization, we stimulated healthy monocytes with plasma from 16 asymptomatic atherosclerotic patients in comparison to 4 healthy subjects. We observed significant differences in percentage of all monocyte subsets between patients and healthy controls ($p < 0.05$ for non-classical, intermediate, and classical monocytes) (Figure 1).

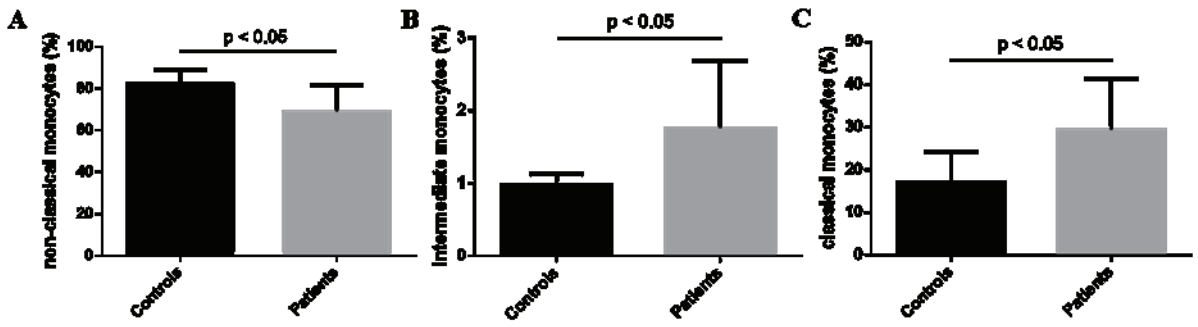


Figure 1. *Effects of atherosclerotic plasma of atherosclerotic patients and healthy controls on circulating monocyte polarization*

We also observed significant differences in percentage of all monocyte subsets between PA groups. Interestingly, we found a significant higher percentage of non-classical monocytes in patients with both the lowest PA level and the highest SB level in comparison to patients with both the highest PA level and the lowest SB level ($p < 0.05$) (Figure 2A). Regarding intermediate and classical monocytes, we found a significant lower percentage in patients with both the lowest PA level and the highest SB level in comparison to patients with both the highest PA level and the lowest SB level ($p < 0.05$) (Figure 2B and 2C).

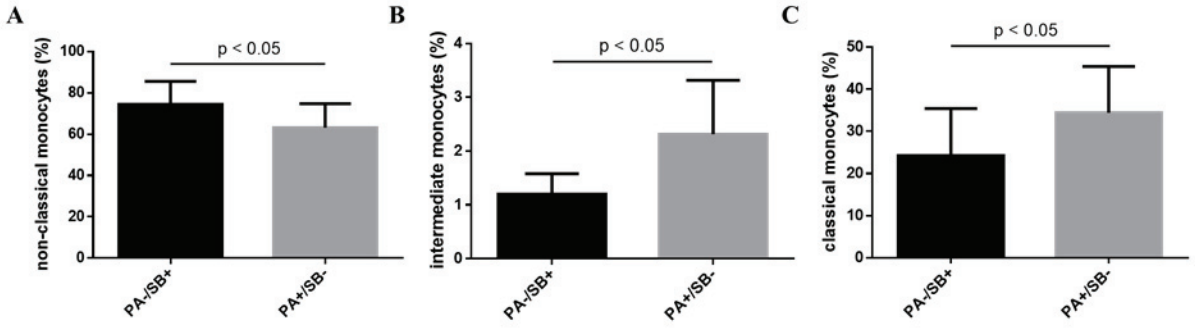


Figure 2. *Effects of physical activity level on circulating monocyte polarization*

Screening of chemokine differentially expressed in atherosclerotic plasma

To understand whether observed different monocyte subset responses among patients and healthy controls (Figure 1), and among PA level groups (Figure 2) were due to chemokine modulation, such as previously suggested (Barlic and Murphy 2007), we screened the plasmatic chemokine signature of the 16 patients and 4 healthy controls. We found that 3 chemokines were differentially expressed

between patients PA level groups: GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), CCL26 (Eotaxin-3) and CCL22 (Macrophage-derived chemokine) (Table 2).

Table 2. *Differentially expressed chemokines between patients PA level groups*

Chemokines	PA-/SB+ (pg/ml)	PA+/SB- (pg/ml)	p-value
GM-CSF	3357.2 ± 241.8	1614.5 ± 105.3	0.02
CCL26/Eotaxin-3	872.9 ± 264.5	662.6 ± 90.4	0.05
CCL22/MDC	2127.4 ± 146.5	1961.3 ± 219.4	0.09

Values are expressed as mean ± SD. GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; CCL26, C-C motif chemokine 26; CCL22/MDC, C-C motif chemokine 22/Macrophage-derived chemokine.

Effects of the identified chemokines on systemic monocyte polarization

To analyze whether the 3 identified chemokines modulated the monocyte subset responses, we stimulated healthy monocytes with recombinant of GM-CSF, CCL26 (Eotaxin-3) and CCL22 (MDC) as well as with a combination of the three chemokine recombinants. We observed that GM-CSF stimulation of healthy monocytes induced the greatest change in percent of intermediate monocytes (Figure 3B). Indeed, when stimulated by GM-CSF, percent in intermediate $CD14^{++}CD16^{+}$ considerably decreased by 7.8-fold. Additionally, CCL22 induced a small change in percent and CCL26 did not induce change in percent of intermediate $CD14^{++}CD16^{+}$ monocytes (Figure 3B). Regarding the non-classical monocytes, GM-CSF stimulation induced a decrease in percent, but similar to the other chemokines (Figure 3A). Regarding the classical monocytes, GM-CSF induced an increase in percent, but similar to the other chemokines (Figure 3C).

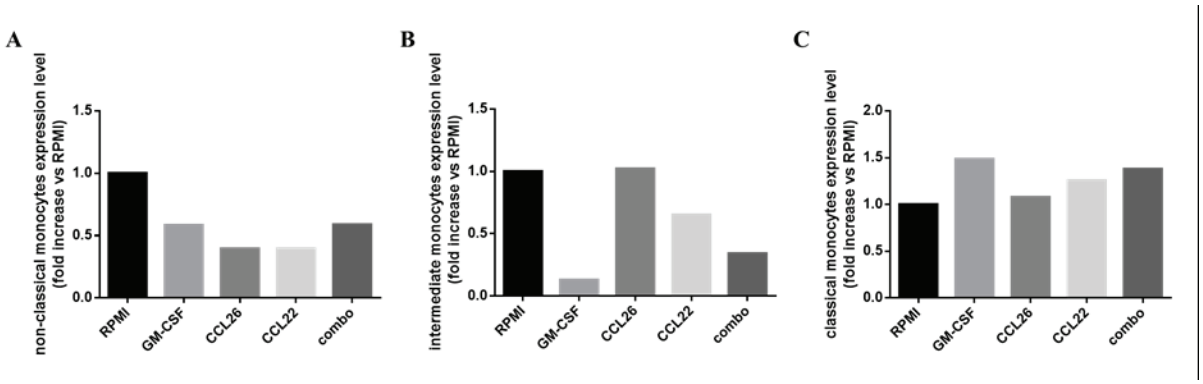


Figure 3. *Effects of identified chemokines on systemic monocyte polarization*

Moreover, we found that 8 chemokines were differentially released when healthy monocytes were stimulated by atherosclerotic plasma in comparison to plasma levels, between PA level groups. Indeed, IL-1β, IL-6, CCL2, CCL8, CCL7, CCL20, MIF and TNF-α were more released in the most sedentary patients (Table 3).

Table 3. *Differentially expressed chemokines after 24h-stimulation of healthy monocytes by atherosclerotic plasma between PA level groups*

Chemokines	PA-/SB+ (pg/ml)	PA+/SB- (pg/ml)	% increase
IL-1β	638.4 ± 355.2	391.9 ± 260.2	62.90
IL-6	277.7 ± 439.4	108.1 ± 75.9	156.89
CCL2/MCP-1	39.1 ± 189.1	-32.1 ± 22.7	221.81
CCL8/MCP-2	246.6 ± 621.1	30.3 ± 77.8	713.86
CCL7/MCP-3	102.9 ± 439.9	-52.7 ± 95.1	295.26
CCL20/MIP-3α	84.9 ± 325.4	31.6 ± 88.4	168.67
MIF	773.4 ± 3335.8	-180.3 ± 6221.6	528.95
TNF-α	154.1 ± 125.5	102.3 ± 57.2	50.64

Values are expressed as mean ± SD. IL-1β, Interleukine-1 β; IL-6, Interleukine-6; MCP-1, Monocyte chemoattractant protein-1; MCP-2, Monocyte chemoattractant protein-2; MCP-3, Monocyte chemoattractant protein-3; MIP-3α, Macrophage inflammatory protein-3; MIF, Macrophage migration inhibitory factor; TNF- α, Tumor necrosis factor- α.

Discussion

The results of this study mainly show that the plasmatic chemokine GM-CSF, negatively associated to physical activity level, may modulate the systemic monocyte phenotype in asymptomatic patients at high-risk of stroke.

Peripheral blood monocytes infiltration into the arterial wall represents one of the first steps of atherogenesis, leading to monocyte differentiation in macrophages. It can be postulated that systemic monocyte polarization could influence macrophage phenotype in early atherosclerotic lesion as previously suggested (Häkkinen et al. 2000). Thus, modulation of monocyte polarization could represent a potential new therapy in atherosclerosis. Higher counts of intermediate $CD14^{++}CD16^{+}$ and classical $CD14^{++}CD16^{-}$ monocytes was recently associated to a first occurrence of cardiovascular death, acute myocardial infarction, or non-hemorrhagic stroke in the largest prospective cohort study on monocyte heterogeneity (Rogacev et al. 2012). Our results exhibit

higher percent of intermediate $CD14^{++}CD16^{+}$ and classical $CD14^{++}CD16^{-}$ monocytes when incubated with plasma of asymptomatic patients with advanced carotid atherosclerotic plaque as well as lower percent of non-classical $CD14^{+}CD16^{++}$ monocytes (Figure 1), confirming these previous observations, from *in vitro* approach consisting to stimulate healthy monocytes with atherosclerotic plasma. This may thus suggest that these monocytic responses could be due, at least partially, to plasmatic factors. Moreover, our results showed significant differences in all monocytes subsets according to PA level with an increase in intermediate $CD14^{++}CD16^{+}$ and classical $CD14^{++}CD16^{-}$ monocytes and a decrease in non-classical $CD14^{+}CD16^{++}$ monocytes in the most physically active patients (Figure 2). These data resulting from *in vitro* stimulation of health monocytes by plasma of atherosclerotic patient are in agreement with previous studies evaluating whole blood monocyte subset responses to acute physical exercise (Hong and Mills 2008; Van Craenenbroeck et al. 2014). However, our results suggest that plasmatic factors could be involved in the modulation of the monocyte subset responses previously reported (Hong and Mills 2008; Van Craenenbroeck et al. 2014).

Based on previous data indicating that chemokine modulation drives monocyte mobilization into the arterial wall (Barlic and Murphy 2007), we screened chemokine levels in the plasma of our patients (according to their PA level) and healthy controls. Among the 3 differentially expressed chemokines, we found that GM-CSF induced the most pronounced change in percent of intermediate $CD14^{++}CD16^{+}$ (7.8-fold decrease) (Figure 3). Although GM-CSF was first described as a leukocyte growth factor, stimulating stem cells to produce granulocytes and monocytes (Francisco-Cruz et al. 2014), it is also known to induce maturation of macrophages into a pro-inflammatory state (leading to expression of IL-12 and IL-23) (Vogel et al. 2015). Regarding monocytes, GM-CSF is known to promote their maturation and their effector functions such as reactive oxygen species and cytokines productions (Borriello et al. 2016), and to increase their migration across endothelial cells (Vogel et al. 2015), explaining its potential important role in atherosclerosis (Adamopoulos et al. 2001). Nevertheless, in other tissues such as in the central nervous system, GM-CSF is considered to be

both neuroprotective and pro-inflammatory in the context of multiple sclerosis (Vogel et al. 2015), underlining its dual role in pathological state. In parallel, we found that CCL22 also induced a decrease in percent of intermediate $CD14^{++}CD16^{+}$ (1.5-fold decrease). Although CCL22 was originally described as a potent attractant for monocyte-derived dendritic cells (Godiska et al. 1997), it is also known to activate platelets and amplify their aggregation (Gleissner et al. 2008). In the context of atherosclerosis, CCL22 was shown to be a marker characterizing the monocytes/macrophages migration into atherosclerotic lesions (Kimura et al. 2012).

Our *in vitro* results suggest that GM-CSF, and to a lesser extent CCL22, could reduce the ratio of intermediate monocytes which are known to express a high pro-inflammatory potential. Since GM-CSF and CCL22 were down-regulated by PA level in our study, such as in a previous study in patients with chronic heart failure for GM-CSF (Adamopoulos et al. 2001) and in healthy subject for CCL22 (Vlaanderen et al. 2017), it could be hypothesized that the increase in GM-CSF, and maybe CCL22, in our most sedentary patients (vs. the most active ones) could partially explain their lower percentage of intermediate monocytes when stimulated with plasma of these patients. Interestingly, we observed that healthy monocytes stimulated by the plasma of the most sedentary patients (vs. the most physically active ones) released higher levels of 8 inflammatory chemokines known to be involved in atherosclerosis such as IL-1β, IL-6, and TNF-α (Libby 2012) or CCL2 and MIF (Gong et al. 2015; Grosse et al. 2016) (see Table 3). By contrast none inflammatory chemokines have been higher released by the monocytes stimulated by the plasma of the most physically active patients (vs. the most sedentary ones). These observations could provide information about the downstream consequences of these monocytic responses to the plasmatic environment of sedentary patients which seems to be pro-inflammatory.

In conclusion, our data suggest that physical activity level in carotid atherosclerosis asymptomatic patients could be associated to a modulation in circulating monocyte phenotype via the decrease expression in GM-CSF and CCL22. Nevertheless, it is necessary to first confirm this hypothesis by blocking these chemokines in our model of healthy monocytes stimulation, analyzing the functional

characteristics of these monocytes (i.e. their phagocytic capacity) and extend the number of patients. Further studies are also needed to understand the relation between potential immunotherapy targeting the chemokine and physical activity therapy.

References

Adamopoulos S, Parissis J, Kroupis C, et al (2001) Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. Eur Heart J 22:791–797. doi: 10.1053/euhj.2000.2285

Barlic J, Murphy PM (2007) Chemokine regulation of atherosclerosis. J Leukoc Biol 82:226–236. doi: 10.1189/jlb.1206761

Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, et al (2002) The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. J Immunol Baltim Md 1950 168:3536–3542

Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L, et al (2012) Elevated CD14++CD16- monocytes predict cardiovascular events. Circ Cardiovasc Genet 5:122–131. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.960385

Borriello F, Iannone R, Di Somma S, et al (2016) GM-CSF and IL-3 Modulate Human Monocyte TNF-α Production and Renewal inIn VitroModels of Trained Immunity. Front Immunol 7:680. doi: 10.3389/fimmu.2016.00680

Cros J, Cagnard N, Woollard K, et al (2010) Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. Immunity 33:375–386. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.012

Crum RM, Anthony JC, Bassett SS, Folstein MF (1993) Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and educational level. JAMA 269:2386–2391

Francisco-Cruz A, Aguilar-Santelises M, Ramos-Espinosa O, et al (2014) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. Med Oncol Northwood Lond Engl 31:774. doi: 10.1007/s12032-013-0774-6

Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity 19:71–82

Gleissner CA, von Hundelshausen P, Ley K (2008) Platelet chemokines in vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 28:1920–1927. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.169417

Godiska R, Chantry D, Raport CJ, et al (1997) Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. J Exp Med 185:1595–1604

Gong Z, Xing S, Zheng F, Xing Q (2015) Increased expression of macrophage migration inhibitory factor in aorta of patients with coronary atherosclerosis. J Cardiovasc Surg (Torino) 56:631–637

323 Grip O, Bredberg A, Lindgren S, Henriksson G (2007) Increased subpopulations of CD16(+)
324 and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. Inflamm Bowel
325 Dis 13:566–572. doi: 10.1002/ibd.20025

326 Grosse GM, Schulz-Schaeffer WJ, Teebken OE, et al (2016) Monocyte Subsets and Related
327 Chemokines in Carotid Artery Stenosis and Ischemic Stroke. Int J Mol Sci 17:433. doi:
328 10.3390/ijms17040433

329 Häkkinen T, Karkola K, Ylä-Herttuala S (2000) Macrophages, smooth muscle cells,
330 endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more
331 advanced human atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes of oxidized low-
332 density lipoprotein, scavenger receptor, and CD16 (Fc gammaRIII). Virchows Arch Int
333 J Pathol 437:396–405

334 Haute Autorité de Santé (2015) Prévention Vasculaire après un infarctus cérébral ou un
335 accident ischémique transitoire

336 Hong S, Mills PJ (2008) Effects of an exercise challenge on mobilization and surface marker
337 expression of monocyte subsets in individuals with normal vs. elevated blood pressure.
338 Brain Behav Immun 22:590–599. doi: 10.1016/j.bbi.2007.12.003

339 Idzkowska E, Eljaszewicz A, Miklasz P, et al (2015) The Role of Different Monocyte Subsets
340 in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. Scand J
341 Immunol 82:163–173. doi: 10.1111/sji.12314

342 Kimura S, Tanimoto A, Wang K-Y, et al (2012) Expression of macrophage-derived
343 chemokine (CCL22) in atherosclerosis and regulation by histamine via the H2
344 receptor. Pathol Int 62:675–683. doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02854.x

345 Libby P (2012) Inflammation in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 32:2045–
346 2051. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179705

347 Libby P, Hansson GK (1991) Involvement of the immune system in human atherogenesis:
348 current knowledge and unanswered questions. Lab Investig J Tech Methods Pathol
349 64:5–15

350 Pinto A, Di Raimondo D, Tuttolomondo A, et al (2012) Effects of physical exercise on
351 inflammatory markers of atherosclerosis. Curr Pharm Des 18:4326–4349

352 Redgrave JN, Gallagher P, Lovett JK, Rothwell PM (2008) Critical cap thickness and rupture
353 in symptomatic carotid plaques: the oxford plaque study. Stroke J Cereb Circ 39:1722–
354 1729. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.507988

355 Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, et al (2012) CD14++CD16+ monocytes independently
356 predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective
357 coronary angiography. J Am Coll Cardiol 60:1512–1520. doi:
358 10.1016/j.jacc.2012.07.019

359 Rosenberg DE, Norman GJ, Wagner N, et al (2010) Reliability and validity of the Sedentary
360 Behavior Questionnaire (SBQ) for adults. J Phys Act Health 7:697–705

Sofi F, Capalbo A, Cesari F, et al (2008) Physical activity during leisure time and primary prevention of coronary heart disease: an updated meta-analysis of cohort studies. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 15:247–257. doi: 10.1097/HJR.0b013e3282f232ac

Stein RA, Rockman CB, Guo Y, et al (2015) Association Between Physical Activity and Peripheral Artery Disease and Carotid Artery Stenosis in a Self-Referred Population of 3 Million Adults. Arterioscler Thromb Vasc Biol 35:206–212. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304161

Steppich B, Dayyani F, Gruber R, et al (2000) Selective mobilization of CD14(+)CD16(+) monocytes by exercise. Am J Physiol Cell Physiol 279:C578-586. doi: 10.1152/ajpcell.2000.279.3.C578

Van Craenenbroeck AH, Van Ackeren K, Hoymans VY, et al (2014) Acute exercise-induced response of monocyte subtypes in chronic heart and renal failure. Mediators Inflamm 2014:216534. doi: 10.1155/2014/216534

Vlaanderen J, van Veldhoven K, Font-Ribera L, et al (2017) Acute changes in serum immune markers due to swimming in a chlorinated pool. Environ Int 105:1–11. doi: 10.1016/j.envint.2017.04.009

Vogel DYS, Kooij G, Heijnen PDAM, et al (2015) GM-CSF promotes migration of human monocytes across the blood brain barrier. Eur J Immunol 45:1808–1819. doi: 10.1002/eji.201444960

Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, et al (2011) Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. Blood 118:e16-31. doi: 10.1182/blood-2010-12-326355

Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, et al (2011) SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. Blood 118:e50-61. doi: 10.1182/blood-2011-01-326827

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood 116:e74–e80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558

ÉTUDE 4 : L'ACTIVITE PHYSIQUE AMELIORE LE PROFIL HEMORHEOLOGIQUE PAR UNE DIMINUTION DE L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE CHEZ DES PATIENTS A RISQUE D'AVC

Mury P, Faes C, Millon A, Mura M, Renoux C, Skinner S, Nicaise V, Joly P, Della Schiava N, Lermusiaux P, Connes P*, Pialoux V*.

Publié dans *Frontiers in Physiology* 2017 Dec 12 ;8 :1043

** places équivalentes*

Les études 1 et 3 nous ont permis d'apporter des éléments de réponse quant à l'impact de l'activité physique sur des paramètres histologiques d'instabilité de la plaque d'athérosclérose. Néanmoins, il apparait clairement que des paramètres hémodynamiques peuvent également favoriser à la fois la formation et la rupture de plaque. En effet, les plaques se forment spécifiquement au niveau des bifurcations du système artériel, là où le flux sanguin est perturbé. Aussi, comme expliqué dans le chapitre 4 de ce manuscrit, il a été montré qu'une forte pression artérielle pouvait entrainer un durcissement et un épaississement de la paroi artérielle, et dans les zones pro-athérogènes, le développement subséquent d'une plaque d'athérosclérose (Kensey 2003). Il a également été montré que des facteurs mécaniques, tels qu'une contrainte de cisaillement oscillante, pouvaient augmenter le risque de rupture de la plaque (Pedrigi et al. 2014 ; Li et al. 2014). Ces différents paramètres entrainant la formation et la potentielle rupture de plaque sont associés à des paramètres hémorhéologiques, en particulier la viscosité sanguine. Enfin, il a été montré dans la littérature que l'activité physique régulière avait des effets bénéfiques sur l'hémorhéologie, à la fois chez des sujets sains mais également chez des patients cardiovasculaires (Connes et al. 2013). Ainsi, l'objectif de cette étude est de comparer les profils hémorhéologiques de patients symptomatiques et asymptomatiques à risque d'AVC avec des sujets sains et d'évaluer l'association entre le niveau d'activité physique des patients et leur profil hémorhéologique.

Pour analyser cela, nous avons réalisé des mesures de la viscosité sanguine (à l'aide d'un viscosimètre cône/plan), de la déformabilité et de l'agrégation des globules rouges (par ektacytométrie) ainsi que des dosages de fibrinogène plasmatique dans une cohorte de 80 patients (15 symptomatiques et 65 asymptomatiques), et 14 sujets sains d'âge comparable. Dans un second temps, nous avons évalué les niveaux d'activité physique des patients à l'aide du questionnaire Global Physical Activity Questionnaire. Et, à partir des 68 patients ayant répondu au questionnaire, nous avons comparé les paramètres hémorhéologiques en fonction du niveau d'activité physique (population divisée en tertiles).

Les principaux résultats de cette étude démontrent l'effet bénéfique de l'activité physique sur les facteurs hémorhéologiques, par l'intermédiaire d'une diminution de l'agrégation érythrocytaire, dans une cohorte de patients symptomatiques et asymptomatiques à risque d'AVC.

Dans un premier temps, nous avons évalué les différences de profils hémorhéologiques entre les patients symptomatiques, les patients asymptomatiques et des contrôles sains d'âge comparable. Les résultats de cette première étape montrent une augmentation significative de la viscosité sanguine chez les patients symptomatiques par rapport aux contrôles sains, ainsi qu'une tendance d'augmentation entre les patients asymptomatiques et les contrôles sains. Nous avons également observé une tendance d'augmentation de l'agrégation érythrocytaire chez les patients symptomatiques par rapport aux sujets sains. Ainsi, l'ensemble de ces résultats laissent suggérer que les patients les plus sévères (i.e ayant eu un accident ischémique) présentent un profil hémorhéologique plus altéré (hyperviscosité sanguine et hyper-agrégation érythrocytaire). Ainsi, les modifications de contraintes de cisaillement à la paroi vasculaire liées à l'hyperviscosité sanguine et l'augmentation du risque de dépôt d'agrégats érythrocytaires au niveau des bifurcations artérielles pourraient augmenter le risque d'AVC chez les patients présentant une sténose carotidienne. Dans un second temps, nous avons évalué l'association entre le niveau d'activité physique pratiqué et les paramètres hémorhéologiques, uniquement dans le contexte de l'athérosclérose (i.e. seulement pour les patients, symptomatiques et asymptomatiques). Les résultats de cette seconde étape démontrent une diminution significative de l'agrégation des globules rouges chez les patients les plus actifs de notre cohorte par rapport aux moins actifs. Nous pouvons également observer une diminution significative de la force de désagrégation des globules rouges. De plus, ces deux paramètres sont négativement corrélés au niveau d'activité physique. Ces résultats suggèrent que la pratique d'une activité physique régulière pourrait limiter l'altération des paramètres hémorhéologiques par l'intermédiaire d'une amélioration des propriétés d'agrégation érythrocytaire permettant potentiellement de minimiser les risques de

rupture de plaque d'athérosclérose carotidienne. Néanmoins, des études complémentaires avec des mesures objectives de l'activité physique sont nécessaires pour confirmer l'effet bénéfique de l'activité physique sur l'agrégation des globules rouges dans cette population spécifique.

frontiers in Physiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 12 December 2017
doi: 10.3389/fphys.2017.01043

Higher Daily Physical Activity Level Is Associated with Lower RBC Aggregation in Carotid Artery Disease Patients at High Risk of Stroke

Pauline Mury[1,2], Camille Faes[1,2], Antoine Millon[3,4], Mathilde Mura[1,2], Céline Renoux[1,2,5], Sarah Skinner[1,2], Virginie Nicaise[6], Philippe Joly[1,2,5], Nellie Della Schiava[4], Patrick Lermusiaux[4], Philippe Connes[1,2,7†] and Vincent Pialoux[1,2,7†]*

[1] Interuniversity Laboratory of Human Movement Biology EA7424, Vascular Biology and Red Blood Cell Team, University Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France, [2] Laboratory of Excellence GR-Ex, Paris, France, [3] CarMeN Laboratory, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1060, University Claude Bernard Lyon 1, Bron, France, [4] Department of Vascular Surgery, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France, [5] Biochimie des Pathologies Erythrocytaires, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, [6] Laboratory of Vulnerabilities and Innovation in Sport EA7428, University Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France, [7] Institut Universitaire de France, Paris, France

Aim: Carotid artery disease (CAD) is an atherosclerotic inflammatory disease that affects the arterial wall, specifically at points of bifurcation where blood flow is disturbed. Abnormal blood rheology could participate in the pathophysiology of ischemic cardiovascular disease. Physical activity (PA) is known to improve blood rheology in several chronic disorders. This study aims to (i) compare the hemorheological profile of CAD patients and controls and (ii) investigate the associations between daily PA and hemorheological parameters in CAD patients.

Methods: Blood viscosity, red blood cell (RBC) aggregation and RBC deformability were assessed in 80 patients (15 symptomatic and 65 asymptomatic) and 14 age-matched controls. Patients' PA levels were evaluated using questionnaires.

Results: Symptomatic patients showed increased blood viscosity and RBC aggregation compared to healthy controls. RBC aggregation was significantly lower in the most physically active patients compared to the least physically active ones. Blood viscosity and RBC deformability did not vary according to physical activity level.

Conclusions: Our results showed greater hemorheological abnormalities (blood hyper-viscosity and hyper-aggregation of red blood cells) in the most severe CAD patients, which could exacerbate the risk of stroke in patients with stenosis. As the most physically active patients had lower RBC aggregation than those who were less physically active, it is possible that regular PA may limit hemorheological alterations in CAD patients.

Keywords: atherosclerosis, blood rheology, chronic physical activity, red blood cell aggregation, stroke

OPEN ACCESS

Edited by:
Barbara Morgan, University of Wisconsin-Madison, United States

Reviewed by:
Shane A. Phillips, University of Illinois at Chicago, United States
Karen Peebles, Macquarie University, Australia

***Correspondence:**
Vincent Pialoux
vincent.pialoux@univ-lyon1.fr

† These authors have contributed equally to this work.

Specialty section:
This article was submitted to Exercise Physiology, a section of the journal Frontiers in Physiology

Received: *16 August 2017*
Accepted: *29 November 2017*
Published: *12 December 2017*

Citation:
Mury P, Faes C, Millon A, Mura M, Renoux C, Skinner S, Nicaise V, Joly P, Della Schiava N, Lermusiaux P, Connes P and Pialoux V (2017) Higher Daily Physical Activity Level Is Associated with Lower RBC Aggregation in Carotid Artery Disease Patients at High Risk of Stroke. Front. Physiol. 8:1043. doi: 10.3389/fphys.2017.01043

INTRODUCTION

Atherosclerosis is the leading cause of mortality and morbidity in western countries, and will likely become the leading cause of death worldwide in the near future. Atherosclerosis is a complex inflammatory disease that affects the arterial wall, leading to atherosclerotic plaque formation (Redgrave et al., 2008). Atherosclerotic plaques build up in specific regions of the arterial system, such as in carotid bifurcations, the aortic arch, and in the femoral arteries. In these regions, blood flow is disturbed and the expression of biomarkers of atherogenesis and thrombosis correlates with the extent of flow recirculation patterns (Martorell et al., 2014). In atherosclerotic patients carotid plaque rupture can lead to major ischemic events, such as stroke and transient ischemic attack (TIA) (Redgrave et al., 2008).

Over the last two decades, several studies have investigated the role of blood rheology in cardiovascular diseases, particularly in ischemic disease (Wood and Kee, 1985; Fisher and Meiselman, 1991). Blood viscosity represents the resistance of blood to flow and may be affected by the proportion of red blood cells (RBC) in the blood (i.e., hematocrit), as well as by the rheological properties of these RBCs: i.e., RBC deformability and RBC aggregation (Baskurt and Meiselman, 2003). RBC aggregation is a reversible process, which affects blood viscosity at low shear rate. In contrast, RBC deformability influences blood viscosity mainly at high shear rate. When RBC deformability decreases, RBCs loose their ability to properly orient themselves in the direction of the blood flow, thereby increasing blood viscosity. Nevertheless, RBC aggregation has been shown to affect blood flow in both micro- and macro-vessels where shear rate is high, notably because of its effects on several rheological phenomena such as axial migration, cell free layer formation, and the Fahraeus effect, the latter occurring mainly in the microcirculation (Baskurt and Meiselman, 2008). Recently, it was shown that patients with symptomatic ischemic cerebral events had increased blood viscosity in comparison to asymptomatic patients (Li et al., 2015; Totsimon et al., 2016) and healthy controls (Velcheva et al., 2006). Lower RBC deformability could be at the origin of this blood hyper-viscosity (Totsimon et al., 2016). Research also suggests that RBC aggregation could play a role in ischemic cerebral disease (Zeltser et al., 2001). Interestingly, Assayag et al. reported an association between increased RBC aggregation and the degree of stenosis in patients with asymptomatic carotid artery disease (Assayag et al., 2008). Indeed, abnormal blood rheology could be involved in the pathophysiology of ischemic stroke.

Regular physical activity (PA) has been shown to have beneficial effects on atherosclerosis, particularly in preventing adverse cardiovascular events (Sofi et al., 2008) and reducing the incidence of carotid artery disease (Stein et al., 2015). Regular PA has been shown to reduce cardiovascular risk factors, such as blood lipids, cholesterol, and body mass index (BMI) (Taylor et al., 2014). In addition, regular PA could have beneficial effects on blood rheology in healthy subjects and patients with cardiovascular or metabolic diseases (Connes et al., 2013). For example, Sandor et al. demonstrated a reduction in blood viscosity after 12 and 24 weeks of moderate aerobic exercise training in ischemic heart disease patients (Sandor et al., 2014). This reduction was attributed to decreased RBC aggregation and improved RBC deformability (Sandor et al., 2014). However, it is currently unknown whether high levels of PA, defined as 300 min or more of moderate-intensity PA per a week, (compared to moderate levels of PA, defined as less than 150 min of moderate-intensity PA per week) could limit, or improve, blood rheological alterations in patients at high risk of ischemic stroke, as it has been shown to do in cardiovascular disease patients.

The aim of the present study was (i) to compare the blood rheological profile of symptomatic and asymptomatic patients at high-risk of stroke who underwent endarterectomy surgery with age-matched healthy controls and (ii) to evaluate the associations between daily PA level and blood rheology in these patients. We hypothesized that symptomatic patients would present more blood rheological abnormalities than asymptomatic patients, and that PA could limit these alterations. Questionnaires, such as the GPAQ, are a simple, safe, valid, and reliable way to initially evaluate patients' PA levels, which could easily be used in a clinical setting.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Eighty patients (67 men and 13 women of 68.7 ± 10.8 years) undergoing carotid endarterectomy in the vascular surgery department of Edouard Herriot Hospital of Lyon were included in this study. Among them, 15 were symptomatic (i.e., patients who had a history of ischemic events, including ischemic stroke or transient ischemic attack) and 65 were asymptomatic (i.e., patients with no history of ischemic events). All symptomatic and asymptomatic CAD patients underwent unilateral carotid endarterectomy, except for three patients who underwent two surgeries at a 4–6 weeks interval. Carotid stenosis was measured and quantified by Doppler ultrasound and confirmed by either magnetic resonance or computed tomography angiography 1–6 months before the surgery. Six patients also presented with bilateral carotid stenosis, but were only operated on one side. All patients were treated by statins, platelet anti-aggregants and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, as recommended by the French national guidelines (Haute Autorité de Santé, 2015) for patients with planned endarterectomy. Within 30 min before surgery (just before anesthesia), venous blood samples (2 × 7 ml) were drawn from the cephalic vein in tubes containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). Patients were in a fasted state. Written informed consent for the analysis of blood was obtained from all patients before surgery. This study was approved by the local ethics committee. Main cardiovascular risk factors, including hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, smoking status, and body mass index (BMI), were recorded by the anesthetist. Fourteen age-matched healthy persons were also included as controls (63.6 ± 13.0 years, 6 men and 8 women) for blood rheological measurements only, with blood sampled in the fasted state.

Questionnaires

Among the 80 patients included in this study, only 68 answered questionnaires (12 patients did not respond). All patients responded to two questionnaires by phone. The Mini Mental State Examination (MMSE) questionnaire was used to confirm their mental health state after the surgery, and the Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ) was used to measure the recreational PA levels of 68 of the 80 patients (13 symptomatic patients and 55 asymptomatic patients).

The GPAQ was originally designed by the World Health Organization (WHO) to assess PA patterns in western countries (Bull et al., 2009). The data in this study were analyzed according to the GPAQ Analysis Guide provided by the WHO (retrieved 2015). Recreational PA was expressed in min/day. For data analysis, all patients (symptomatic and asymptomatic) in the cohort were ranked in increasing order of duration of daily PA, and divided by 3 to obtain three PA tertiles corresponding to duration of daily PA (T1: 3.3 ± 0.9 min/day, T2: 27.98 ± 1.89 min/day and T3: 109.9 ± 10.18 min/day for the less, intermediate and the more active, respectively).

Biological Parameters and Blood Rheology

Hemoglobin (Hb) concentration, RBC, white blood cell (WBC), platelet, neutrophil, lymphocyte, and monocyte counts of patients were determined using a hematology analyzer (Coulter LH 750, Beckman Coulter, CA, USA). Glucose levels were determined using an automated immunoassay analyzer (Dimension Vista 1500, Siemens, UK).

Blood rheological parameters were measured after full blood oxygenation and within 4 h after sampling in patients and healthy controls. Blood viscosity was measured at native hematocrit (Hct) using a cone/plate viscometer (Brookfield DVII+ with CPE40 spindle; Brookfield Engineering Labs, Natick, MA) at 225 s^{-1} to mimic the shear rates usually found in large arteries such as the carotid artery (Baskurt et al., 2009; Connes et al., 2013). RBC deformability, reported as an elongation index, was determined at 37°C and 9.49 Pa (LORRCA MaxSis; RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands). RBC aggregation, reported as an aggregation index (Hardeman et al., 2001), was determined at 37°C by syllectometry (LORRCA MaxSis; Mechatronics, The Netherlands) after adjustment of Hct to 40%. The RBC disaggregation threshold (γ), the minimal shear rate needed to prevent aggregation or to break down pre-existing RBC aggregates, was determined using a reiteration procedure. The system has been described elsewhere in detail (Baskurt et al., 2009).

Plasma fibrinogen was measured by the Clauss method using an ACL Top automatizer (Werfen, Barcelona, Spain). The Clauss method determines a thrombin time based on optical detection of fibrin formation against a standard curve from a referent plasma sample. The tests were part of the standard clinical care of patients undergoing endarterectomy surgery.

Statistical Analysis

Biological results are expressed as mean ± SEM. A nonparametric Mann-Whitney test was used to compare biological parameters between symptomatic and asymptomatic patients. A nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn *post-hoc's* test was used to compare biological and clinical parameters between PA level tertiles.

Spearman correlation was used to test the relationship between the hemorheological parameters and the percent stenosis, and between the hemorheological parameters and the PA level. A linear multivariate model was used to test the independent predictors of blood viscosity and RBC aggregation. Significance level was defined as $p < 0.05$. Analyses were conducted using GraphPad Prism software (v. 6, San Diego, CA, USA).

RESULTS

General Characteristics and Hematological Parameters

Age, cardiovascular risk factors (hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, smoking, BMI) and biological parameters (RBC, WBC, Hb, platelets, neutrophils, lymphocytes, monocytes, glucose) were not significantly different between symptomatic patients and asymptomatic patients (**Table 1**).

Blood Rheological Parameters in Symptomatic/Asymptomatic Patients

Blood viscosity was significantly higher in symptomatic patients ($p < 0.05$) compared to healthy individuals and a trend

TABLE 1 | Cardiovascular risk factors and biological characteristics in the whole population.

	Symptomatic patients ($n = 15$)	Asymptomatic patients ($n = 65$)	Reference values
Men/Women	12/3	55/10	
Age (years)	69.0 ± 12.6	68.4 ± 9.1	
Hypertension	9 (60%)	43 (66.2%)	
Dyslipidemia	8 (53.3%)	22 (33.8%)	
Diabetes mellitus	2 (15.3%)	19 (29.2%)	
Smoking			
Active	1 (6.67%)	6 (9.23%)	
Weaned	8 (53.3%)	39 (60%)	
Pack-year	45.0 ± 8.16	31.9 ± 3.34	
BMI	27.5 ± 1.38	26.0 ± 0.46	
Percent stenosis	57.5 ± 4.36	69.53 ± 2.53**	
RBC (10^{-12}/L)	4.84 ± 0.17	4.55 ± 0.06	4.5–6
WBC (10^{-9}/L)	8.03 ± 0.95	7.85 ± 0.28	4.0–10.0
Hb (g/L)	134.0 ± 4.61	136.8 ± 1.86	130–170
Platelets (10^{-9}/L)	238.1 ± 14.78	234.3 ± 7.79	150–400
Neutrophils (10^{-9}/L)	5.50 ± 0.85	5.07 ± 0.23	1.8–7.5
Lymphocytes (10^{-9}/L)	1.74 ± 0.19	1.96 ± 0.09	1.0–4.0
Monocytes (10^{-9}/L)	0.57 ± 0.07	0.65 ± 0.03	0.2–0.9
Glucose (mmol/L)	5.90 ± 0.31	6.64 ± 0.36	4.1–5.8

*Values are expressed as mean ± SEM, and percent within the group. BMI, body mass index; RBC, red blood cell count, WBC, white blood cell count, Hb, hemoglobin. **$p < 0.01$ significant difference compared to symptomatic patients.*

($p = 0.0595$) for higher blood viscosity in asymptomatic patients compared to healthy controls was also observed (**Figure 1A**).

No significant differences were observed between the groups for RBC aggregation (**Figure 1B**). Nevertheless, RBC aggregation tended to be higher in symptomatic compared to healthy controls ($p = 0.0761$). Moreover, RBC aggregation was positively correlated with the percent of stenosis ($p < 0.05$; $r = 0.889$) in symptomatic patients. RBC deformability (**Figure 1C**), Hct, fibrinogen level, and RBC aggregates strength did not differ between the three groups (**Table 2**). In addition, although the dosage of statins, platelet antiaggregants, and ACE inhibitors may differ between subjects, we did not find any significant correlations between the dose of these drugs and blood rheological parameters (data not shown).

Blood Rheological Parameters and Daily Physical Activity Effects

No differences in age or in cardiovascular risk factors (hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, smoking, BMI) were found between the patients' subgroups, which were composed according to their daily PA level. Higher WBC (9.03 ± 0.82 vs. 6.79 ± 0.38 10^{-9} /L, respectively, $p < 0.05$), neutrophil (6.39 ± 0.74 vs. 4.19 ± 0.29 10^{-9}/L, respectively, $p < 0.01$) and platelet counts (260.7 ± 17.76 vs. 208.0 ± 8.41 10^{-9}/L, respectively, $p < 0.05$) were found in the less physically active patients (T1) compared to the most physically active ones (T3). Monocytes tended to be higher in T1 than in T3 ($p = 0.0597$). Nevertheless, WBC, neutrophil, platelet, and monocyte counts remained in the normal range of values across the three groups. No other differences in biological parameters (RBC, Hb, lymphocytes, glucose) were found between tertiles. General characteristics regarding the tertiles are reported in **Table 3**.

RBC aggregation was significantly higher ($p < 0.01$) in T1 compared to T3 ($p < 0.01$) and in T2 compared to T3 ($p < 0.05$) (**Figure 2A**), but did not differ between T1 and T2 (**Figure 2A**). RBC aggregation was negatively correlated with PA level ($p < 0.001$; $r = -0.4423$) for all patients (symptomatic and asymptomatic).

RBC aggregates strength (i.e., the force needed to dissociate the RBC aggregates; also called the RBC disaggregation threshold) was significantly higher ($p < 0.05$) in T1 compared to T3 (**Figure 2B**). No difference in RBC aggregates strength was observed between T1 and T2 or T2 and T3. RBC aggregates strength was negatively correlated with the PA level ($p < 0.01$; $r = -0.3466$) in all patients (symptomatic and asymptomatic). The other hemorheological parameters did not differ between the tertiles (**Table 4**).

A linear multivariate model was used to test the independent association between all of the parameters listed in **Table 3** and blood viscosity or RBC aggregation. For blood viscosity, the overall model was not significant ($R^2 = 0.31$, $p = 0.28$). In contrast, the model was significant for RBC aggregation ($R^2 = 0.52$, $p = 0.05$) with PA being the only factor independently associated with RBC aggregation.

DISCUSSION

Our results show that a higher daily physical activity level is associated with lower RBC aggregation and decreased RBC aggregates strength in patients at high-risk of stroke who underwent endarterectomy surgery. Moreover, RBC aggregation

TABLE 2 | Hemorheological parameters in symptomatic patients, asymptomatic patients at high-risk of stroke and healthy controls.

	Symptomatic patients ($n = 15$)	Asymptomatic patients ($n = 65$)	Healthy controls ($n = 14$)
RBC aggregates strength (s^{-1})	310.8 ± 63.6	319.0 ± 28.03	254.5 ± 24.82
Hct (%)	40.5 ± 0.84	41.7 ± 0.63	41.1 ± 0.47
Fibrinogen (g/L)	3.85 ± 0.25	3.52 ± 0.14	3.54 ± 0.24

Values are expressed as mean ± SEM.

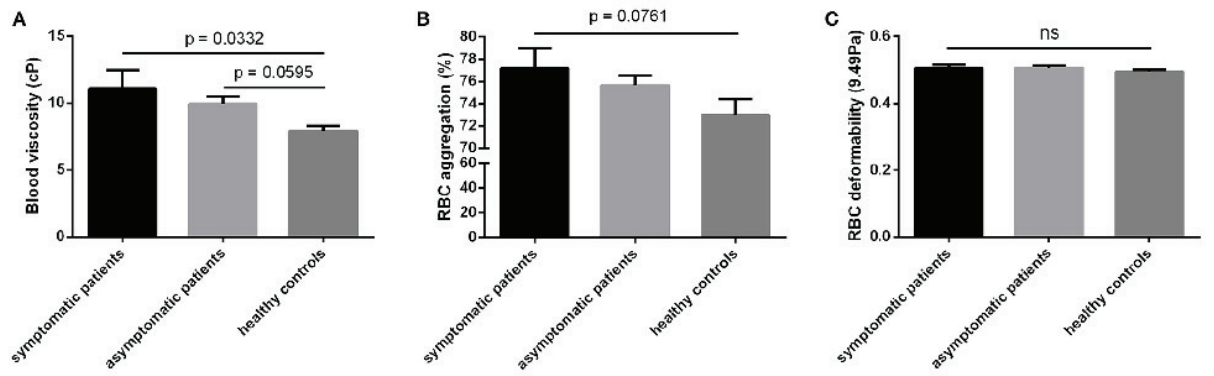


FIGURE 1 | Hemorheological parameters of symptomatic patients, asymptomatic patients at high-risk of stroke and healthy controls. **(A)** Blood viscosity in cP, **(B)** RBC aggregation in % and **(C)** RBC deformability at 9.49Pa. Values are expressed as mean ± SEM.

TABLE 3 | Cardiovascular risk factors and biological characteristics of the different subgroups divided according to their PA level.

	Physical activity T1 ($n = 21$)	Physical activity T2 ($n = 23$)	Physical activity T3 ($n = 24$)	References values
Men/Women	16/5	21/2	19/5	
Symptomatic/ asymptomatic	5/16	4/19	4/20	
Age (years)	70.1 ± 2.0	67.7 ± 2.1	68.5 ± 1.9	
Hypertension	14 (66.7%)	16 (69.5%)	17 (70.8%)	
Dyslipidemia	7 (33.3%)	11 (47.8%)	8 (33.3%)	
Diabetes mellitus	7 (33.3%)	5 (21.7%)	5 (20.8%)	
Smoking				
Active	4 (19.0%)	1 (4.35%)	2 (8.33%)	
Weaned	14 (66.7%)	17 (73.9%)	14 (58.3%)	
Pack-year	22.5 ± 7.89	33.3 ± 7.53	25.8 ± 5.47	
BMI	26.7 ± 0.97	26.7 ± 0.93	25.7 ± 0.81	
Percent stenosis	66.67 ± 4.17	70.54 ± 2.76	67.67 ± 3.41	
RBC (10^{-12}/L)	4.47 ± 0.13	4.57 ± 0.11	4.50 ± 0.10	4.5–6
WBC (10^{-9}/L)	9.03 ± 0.82	8.07 ± 0.41	6.79 ± 0.38*	4.0–10.0
Hb (g/L)	134.2 ± 3.88	139.5 ± 2.80	135.0 ± 3.31	130–170
Platelets (10^{-9}/L)	260.7 ± 17.76	241.3 ± 10.38	208.0 ± 8.41*	150–400
Neutrophils (10^{-9}/L)	6.39 ± 0.74	5.30 ± 0.34	4.19 ± 0.29**	1.8–7.5
Lymphocytes (10^{-9}/L)	1.91 ± 0.17	1.91 ± 0.14	1.80 ± 0.16	1.0–4.0
Monocytes (10^{-9}/L)	0.72 ± 0.08	0.68 ± 0.05	0.55 ± 0.03	0.2–0.9
Glucose (mmol/L)	6.19 ± 0.53	6.46 ± 0.46	6.43 ± 0.52	4.1–5.8

*Tertiles; T1, the less physically active patients (3.3 ± 0.9 min/day), T2, the intermediate physically active patients (27.98 ± 1.89 min/day), T3, the most physically active patients (109.9 ± 10.18 min/day). Values are expressed as mean ± SEM, and percent within the group. BMI, body mass index; RBC, red blood cell count, WBC, white blood cell count, Hb, hemoglobin. *$p < 0.05$ **$p < 0.01$ significant difference compared to T1.*

and blood hyperviscosity tended to be higher in the most symptomatic patients.

As previously described in the literature (Koenig and Ernst, 1992; Velcheva et al., 2006, 2010; Li et al., 2015) blood viscosity was significantly increased in carotid symptomatic patients in comparison to healthy subjects. We also found a tendency ($p = 0.059$) for asymptomatic patients to have higher blood viscosity than healthy subjects. As previously mentioned, blood viscosity is primarily determined by hematocrit, plasma viscosity, RBC deformability, and aggregation (Dintenfass, 1985). In our study, RBC deformability did not differ between symptomatic patients, asymptomatic patients, and healthy subjects, while RBC aggregation tended to be higher in symptomatic patients compared to healthy subjects. Although blood viscosity was measured at a high shear rate (225 s^{-1}), it is possible that the presence of persistent RBC aggregates could have affected blood viscosity. Indeed, several studies have previously demonstrated the presence of persistent RBC aggregates in large arteries, where the shear rate is over 50–100 s^{-1} (Baskurt and Meiselman, 2008). In the present study, the mean RBC disaggregation threshold in both symptomatic and asymptomatic patients was around 300 s^{-1}. Therefore, it is possible that the tendency for increased RBC aggregation observed in the symptomatic patient group, compared to the control group, could be partially responsible for the higher blood viscosity found in this group. A limitation of this study is that blood viscosity was not measured at a low shear rate (i.e., <1 s^{-1}), when RBC aggregates are present in a large proportion.

Our study also showed a positive correlation between RBC aggregation and the percent of stenosis in symptomatic patients. It has previously been demonstrated that increased RBC aggregation enhances the axial migration of RBC, increases the width of the cell-free layer near the vascular wall, and promotes the migration of platelets and leucocytes to the endothelium, hence favoring their adhesion (Goldsmith et al., 1999; Baskurt et al., 2007). Increased cellular adhesion is clearly identified as a major risk factor for atherosclerosis and plaque formation (Galkina and Ley, 2007). Moreover, RBC adherence to the arterial wall may be increased at arterial bifurcations. The elevated amount of circulating, sticky RBC aggregates present in CAD could exacerbate this phenomenon, as has been previously demonstrated in sickle cell disease (Loiseau et al., 2015). The increased deposition of RBC aggregates into the vascular wall would then participate in the alteration of flow dynamics around the bifurcations and promote the deposition of other circulating cellular elements involved in atherogenesis.

Previous studies demonstrated a decrease in RBC aggregation after exercise training in healthy individuals and patients with cardiovascular or metabolic diseases (Dintenfass and Lake, 1976; Simmonds et al., 2012; Connes et al., 2013; Sandor et al., 2014; Pabisiak et al., 2015). However, to our knowledge this is the first time that interactions between daily PA level and blood rheology have been investigated in the context of patients at high risk of stroke. Our results support the hypothesis that PA in symptomatic and asymptomatic patients could improve RBC aggregation properties. Fibrinogen is one of the most pro-aggregant molecules in the plasma and can be affected by exercise training (Pabisiak et al., 2015). However, plasma fibrinogen concentration was not different between our three groups. RBC aggregation depends both on cellular (RBC aggregability) and plasma factors (Baskurt and Meiselman, 2009) and it could be hypothesized that regular PA could affect the intrinsic ability of RBC to form aggregates. Regular PA has also been shown to lower oxidative stress and inflammation, and limit the vascular adhesion process, all of which are known to be involved in the development and progression of atherosclerotic plaques (Rush et al., 2005; Pialoux et al., 2009; Szostak and Laurant, 2011). The anti-oxidant and anti-inflammatory effects of regular PA could also explain why the most active patients have decreased RBC aggregation. For example, Hierso et al. demonstrated that higher RBC oxidative stress increased the robustness of RBC aggregates (Hierso et al., 2014). Alternatively, decreased RBC aggregation and RBC aggregates strength could possibly be

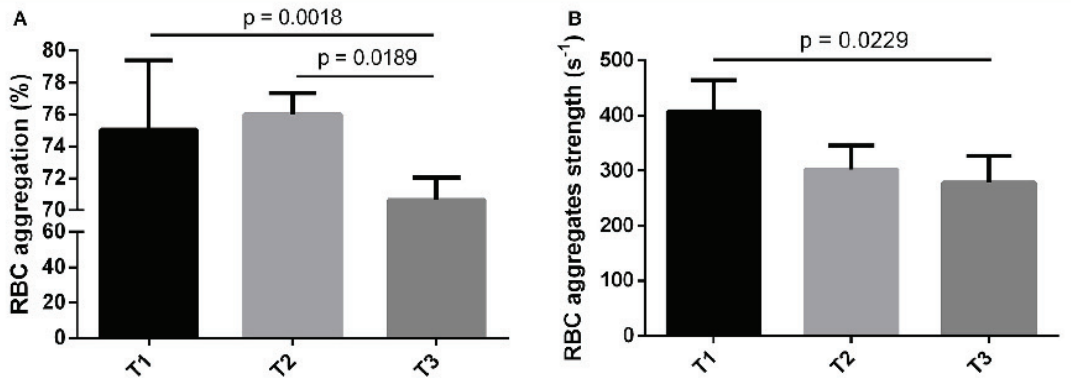


FIGURE 2 | Hemorheological parameters of the different subgroups divided according to their PA level (T = Tertiles). **(A)** RBC aggregation in %, **(B)** RBC aggregates strength in s^{-1}. Values are expressed as mean ± SEM. T1: the less physically active patients (3.3 ± 0.9 min/day), T2: the intermediate physically active patients (27.98 ± 1.89 min/day), T3: the most physically active patients (109.9 ± 10.18 min/day).

TABLE 4 | Hemorheological parameters of the different subgroups divided according to their PA level.

	Physical activity T1 (n = 21)	Physical activity T2 (n = 23)	Physical activity T3 (n = 24)
Blood viscosity (cP)	9.35 ± 0.81	10.75 ± 0.84	8.95 ± 0.49
RBC deformability (9,49Pa, a.u.)	0.439 ± 0.016	0.454 ± 0.006	0.449 ± 0.009
Hct (%)	40.8 ± 1.18	42.9 ± 1.01	40.7 ± 0.93
Fibrinogen (g/L)	3.87 ± 0.28	3.59 ± 0.22	3.34 ± 0.18

T1, the less physically active patients (3.3 ± 0.9 min/day); T2, the intermediate physically active patients (27.98 ± 1.89 min/day); T3, the most physically active patients (109.9 ± 10.18 min/day). Values are expressed as mean ± SEM. A.u, arbitrary units.

attributed to decreased platelet and leucocyte counts in the most active patients. Further studies are needed to better understand the mechanisms of the decreased RBC aggregation in physically active patients at risk of stroke.

The American Heart Association and the European Society of Cardiology have provided PA recommendations for adults to improve overall cardiovascular health and prevent cardiovascular diseases (Perk et al., 2013; Eckel et al., 2014). Currently, these organizations recommend that adults practice 30 min of moderate PA (at 70–85% of maximal heart rate), 3–5 times a week. Furthermore, it appears that long-term exercise training is more beneficial than short-term exercise training in improving cardiovascular morbidity and mortality prognosis (Giannuzzi et al., 2008; Wood et al., 2008). In our study, we assessed daily PA level, which can be used to extrapolate long-term PA. We observed patients whose daily PA surpassed the 30 min a day recommended by the European Society of Cardiology (respectively T3: 109.9 ± 10.18 vs. T1: 3.26 ± 0.89 and T2: 27.98 ± 1.89 min/day), presented with fewer rheological abnormalities.

One limitation of our study could be the relative subjectivity of the GPAQ responses, since in the general population (Laeremans et al., 2017) and in cancer patients (Ruiz-Casado et al., 2016) the GPAQ has been shown to slightly overestimate PA level when compared to accelerometer data. However the GPAQ is a standardized and validated questionnaire (Cleland et al., 2014). In this context, the overestimation reported in these studies (Ruiz-Casado et al., 2016; Laeremans et al., 2017) was related to PA intensity level (in METs) and not to the duration of PA per day, which is the criteria that we used to characterize our PA values. Furthermore, although PA questionnaires may overestimate energy expenditures, the PA thresholds reported in the literature corresponding to decreased cardiovascular risk have been confirmed using questionnaires, including the GPAQ, in large cohorts of subjects (World Health Organization, 2010; Kyu et al., 2016; Zhao et al., 2016; Poggio et al., 2017). Finally, the differences found between the three tertile groups (3.3 vs. 27.9 vs. 109.9 min/day) are sufficiently significant to distinguish the effect of PA duration on blood rheology parameters between the groups. Nevertheless, further studies using more objective cardiorespiratory and physical fitness measurements are needed to confirm the relationship between PA and blood rheology in CAD patients.

In conclusion, to the best of our knowledge, our study is the first to suggest that physically active CAD patients at high risk of stroke could present with fewer rheological abnormalities than those who practice little or no PA. This indicates that regular PA could possibly limit the hemorheological alterations generally observed in CAD patients at high risk of stroke, thereby minimizing the risk of carotid arterial stenosis and ischemic events in those patients. Further studies with objective measures of PA are needed to confirm the effect of PA on RBC aggregation in this population.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of the guidelines set by the Declaration of Helsinki with written informed consent from all subjects. All

subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the "CPP Sud-Est IV, Lyon, France."

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PM, PC, and VP participated in design the study; PM, CR, MM, and VN performed the experiments; PM, AM, MM, ND, and PL included the patients; PM, CF, PC, and VP analyzed and interpreted the results; PM, CF, PC, and VP wrote the manuscript; PM, CF, AM, MM, CR, SS, VN, PJ, ND, PL, PC, and VP wrote and edited the manuscript.

FUNDING

This study was funded by the Institut Universitaire de France.

ACKNOWLEDGMENTS

The results of the study are presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification, or inappropriate data manipulation. We thank the operating room staff of the vascular surgery department of Edouard Herriot Hospital for technical support.

REFERENCES

Assayag, E. B., Bova, I., Kesler, A., Berliner, S., Shapira, I., and Bornstein, N. M. (2008). Erythrocyte aggregation as an early biomarker in patients with asymptomatic carotid stenosis. *Dis. Markers* 24, 33–39. doi: 10.1155/2008/184647

Baskurt, O. K., Boynard, M., Cokelet, G. C., Connes, P., Cooke, B. M., Forconi, S., et al. (2009). New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 42, 75–97. doi: 10.3233/CH-2009-1202

Baskurt, O. K., Hardeman, M. R., and Rampling, M. W. (2007). *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. Amsterdam: IOS Press.

Baskurt, O. K., and Meiselman, H. J. (2003). Blood rheology and hemodynamics. *Semin. Thromb. Hemost.* 29, 435–450. doi: 10.1055/s-2003-44551

Baskurt, O. K., and Meiselman, H. J. (2008). RBC aggregation: more important than RBC adhesion to endothelial cells as a determinant of *in vivo* blood flow in health and disease. *Microcirculation* 15, 585–590. doi: 10.1080/10739680802107447

Baskurt, O. K., and Meiselman, H. J. (2009). Red blood cell "aggregability." *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 43, 353–354. doi: 10.3233/CH-2009-1255

Bull, F. C., Maslin, T. S., and Armstrong, T. (2009). Global physical activity questionnaire (GPAQ): nine country reliability and validity study. *J. Phys. Act. Health* 6, 790–804. doi: 10.1123/jpah.6.6.790

Cleland, C. L., Hunter, R. F., Kee, F., Cupples, M. E., Sallis, J. F., and Tully, M. A. (2014). Validity of the global physical activity questionnaire (GPAQ) in assessing levels and change in moderate-vigorous physical activity and sedentary behaviour. *BMC Public Health* 14:1255. doi: 10.1186/1471-2458-14-1255

Connes, P., Simmonds, M. J., Brun, J. F., and Baskurt, O. K. (2013). Exercise hemorheology: classical data, recent findings and unresolved issues. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 53, 187–199. doi: 10.3233/CH-2012-1643

Dintenfass, L. (1985). *Blood Viscosity, Hyperviscosity and hyperviscosaemia*. Lancaster, UK: MTP Press Limited.

Dintenfass, L., and Lake, B. (1976). Exercise fitness, cardiac work and blood viscosity factors in patients and normals. *Eur. Surg. Res.* 8, 174–184.

Eckel, R. H., Jakicic, J. M., Ard, J. D., de Jesus, J. M., Houston Miller, N., Hubbard, V. S., et al. (2014). 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 2960–2984. doi: 10.1016/j.jacc.2013.11.003

Fisher, M., and Meiselman, H. J. (1991). Hemorheological factors in cerebral ischemia. *Stroke* 22, 1164–1169. doi: 10.1161/01.STR.22.9.1164

Galkina, E., and Ley, K. (2007). Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2292–2301. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.149179

Giannuzzi, P., Temporelli, P. L., Marchioli, R., Maggioni, A. P., Balestroni, G., Ceci, V., et al. (2008). Global secondary prevention strategies to limit event recurrence after myocardial infarction: results of the GOSPEL study, a multicenter, randomized controlled trial from the Italian cardiac rehabilitation network. *Arch. Intern. Med.* 168, 2194–2204. doi: 10.1001/archinte.168.20.2194

Goldsmith, H. L., Bell, D. N., Spain, S., and McIntosh, F. A. (1999). Effect of red blood cells and their aggregates on platelets and white cells in flowing blood. *Biorheology* 36, 461–468.

Hardeman, M. R., Dobbe, J. G., and Ince, C. (2001). The laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 25, 1–11.

Haute Autorité de Santé (2015). *Prévention Vasculaire après un Infarctus Cérébral ou un Accident Ischémique Transitoire*. St Denis: Haute Autorité de Santé

Hierso, R., Waltz, X., Mora, P., Romana, M., Lemonne, N., Connes, P., et al. (2014). Effects of oxidative stress on red blood cell rheology in sickle cell patients. *Br. J. Haematol.* 166, 601–606. doi: 10.1111/bjh.12912

Koenig, W., and Ernst, E. (1992). The possible role of hemorheology in atherothrombogenesis. *Atherosclerosis* 94, 93–107. doi: 10.1016/0021-9150(92)90234-8

Kyu, H. H., Bachman, V. F., Alexander, L. T., Mumford, J. E., Afshin, A., Estep, K., et al. (2016). Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-analysis for the global burden of disease study 2013. *BMJ* 354:i3857. doi: 10.1136/bmj.i3857

Laeremans, M., Dons, E., Avila-Palencia, I., Carrasco-Turigas, G., Orjuela, J. P., Anaya, E., et al. (2017). Physical activity and sedentary behaviour in daily life: a comparative analysis of the global physical activity questionnaire (GPAQ) and the sensewear armband. *PLoS ONE* 12:e0177765. doi: 10.1371/journal.pone.0177765

Li, R. Y., Cao, C. Z., Li, Y., and Wang, R. T. (2015). Increased whole blood viscosity is associated with silent cerebral infarction. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 59, 301–307. doi: 10.3233/CH-131760

Loiseau, E., Massiera, G., Mendez, S., Martinez, P. A., and Abkarian, M. (2015). Microfluidic study of enhanced deposition of sickle cells at acute corners. *Biophys. J.* 108, 2623–2632. doi: 10.1016/j.bpj.2015.04.018

Martorell, J., Santomá, P., Kolandaivelu, K., Kolachalama, V. B., Melgar-Lesmes, P., Molins, J. J., et al. (2014). Extent of flow recirculation governs expression of atherosclerotic and thrombotic biomarkers in arterial bifurcations. *Cardiovasc. Res.* 103, 37–46. doi: 10.1093/cvr/cvu124

Pabisiak, A., Bromboszcz, J., Kmiec, S., Dendura, M., Dabrowski, Z., and Smolenski, O. (2015). Changes in the complete blood count and blood rheology in patients after myocardial infarction participating in the rehabilitation programme. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 61, 541–547. doi: 10.3233/CH-151954

Perk, J., De Backer, G., Gohlke, H., Graham, I., Reiner, Z., Verschuren, W. M. M., et al. (2013). [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)]. *G. Ital. Cardiol.* 14, 328–392. doi: 10.1714/1264.13964.

Pialoux, V., Brown, A. D., Leigh, R., Friedenreich, C. M., and Poulin, M. J. (2009). Effect of cardiorespiratory fitness on vascular regulation and oxidative stress in postmenopausal women. *Hypertension* 54, 1014–1020. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138917

Poggio, R., Gutierrez, L., Irazola, V., Rubinstein, A., and Danaei, G. (2017). Preventable ischaemic heart disease and stroke deaths attributable to

insufficient physical activity: a comparative risk assessment analysis in the argentinian population. *Int. J. Sports Exerc. Med.* 3:56. doi: 10.23937/2469-5718/1510056

Redgrave, J. N., Gallagher, P., Lovett, J. K., and Rothwell, P. M. (2008). Critical cap thickness and rupture in symptomatic carotid plaques: the oxford plaque study. *Stroke J. Cereb. Circ.* 39, 1722–1729. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.507988

Ruiz-Casado, A., Alejo, L. B., Santos-Lozano, A., Soria, A., Ortega, M. J., Pagola, I., et al. (2016). Validity of the physical activity questionnaires IPAQ-SF and GPAQ for cancer survivors: insights from a Spanish cohort. *Int. J. Sports Med.* 37, 979–985. doi: 10.1055/s-0042-103967

Rush, J. W., Denniss, S. G., and Graham, D. A. (2005). Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. *Can. J. Appl. Physiol. Rev. Can. Physiol. Appliquée* 30, 442–474. doi: 10.1139/h05-133

Sandor, B., Nagy, A., Toth, A., Rabai, M., Mezey, B., Csatho, A., et al. (2014). Effects of moderate aerobic exercise training on hemorheological and laboratory parameters in ischemic heart disease patients. *PLoS ONE* 9:e110751. doi: 10.1371/journal.pone.0110751

Simmonds, M. J., Minahan, C. L., Serre, K. R., Gass, G. C., Marshall-Gradisnik, S. M., Haseler, L. J., et al. (2012). Preliminary findings in the heart rate variability and haemorheology response to varied frequency and duration of walking in women 65-74 yr with type 2 diabetes. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 51, 87–99. doi: 10.3233/CH-2011-1514

Sofi, F., Capalbo, A., Cesari, F., Abbate, R., and Gensini, G. F. (2008). Physical activity during leisure time and primary prevention of coronary heart disease: an updated meta-analysis of cohort studies. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 15, 247–257. doi: 10.1097/HJR.0b013e3282f232ac

Stein, R. A., Rockman, C. B., Guo, Y., Adelman, M. A., Riles, T., Hiatt, W. R., et al. (2015). Association between physical activity and peripheral artery disease and carotid artery stenosis in a self-referred population of 3 million adults. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 206–212. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304161

Szostak, J., and Laurant, P. (2011). The forgotten face of regular physical exercise: a "natural" anti-atherogenic activity. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 121, 91–106. doi: 10.1042/CS20100520

Taylor, B. A., Zaleski, A. L., Capizzi, J. A., Ballard, K. D., Troyanos, C., Baggish, A. L., et al. (2014). Influence of chronic exercise on carotid atherosclerosis in marathon runners. *BMJ Open* 4:e004498. doi: 10.1136/bmjopen-2013-004498

Totsimon, K., Nagy, A., Sandor, B., Biro, K., Csatho, A., Szapary, L., et al. (2016). Hemorheological alterations in carotid artery stenosis. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 64, 55–63. doi: 10.3233/CH-162043

Velcheva, I., Antonova, N., Damianov, P., and Dimitrov, N. (2010). Common carotid artery hemodynamic factors in patients with cerebral infarctions. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 45, 233–238. doi: 10.3233/CH-2010-1306

Velcheva, I., Antonova, N., Titianova, E., Damianov, P., Dimitrov, N., and Ivanov, I. (2006). Hemorheological parameters in correlation with the risk factors for carotid atherosclerosis. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 35, 195–198.

Wood, D. A., Kotseva, K., Connolly, S., Jennings, C., Mead, A., Jones, J., et al. (2008). Nurse-coordinated multidisciplinary, family-based cardiovascular disease prevention programme (EUROACTION) for patients with coronary heart disease and asymptomatic individuals at high risk of cardiovascular disease: a paired, cluster-randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 371, 1999–2012. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60868-5

Wood, J. H., and Kee, D. B. (1985). Hemorheology of the cerebral circulation in stroke. *Stroke* 16, 765–772. doi: 10.1161/01.STR.16.5.765

World Health Organization (2010). *Global Recommendations on Physical Activity for Health*. Available online at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305057/ (Accessed October 19, 2017)

Zeltser, D., Bornstein, N. M., Rotstein, R., Shapira, I., and Berliner, A. S. (2001). The erythrocyte adhesiveness/aggregation test in the peripheral blood of patients with ischemic brain events. *Acta Neurol. Scand.* 103, 316–319. doi: 10.1034/j.1600-0404.2001.103005316.x

Zhao, S., Zhang, Z., Long, Q., Ma, Y., Lian, X., Yang, Y., et al. (2016). Association between time of day of sports-related physical activity and the onset of acute myocardial infarction in a Chinese population. *PLoS ONE* 11:e0146472. doi: 10.1371/journal.pone.0146472

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Mury, Faes, Millon, Mura, Renoux, Skinner, Nicaise, Joly, Della Schiava, Lermusiaux, Connes and Pialoux. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

PARTIE 4 – CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer les relations entre l'activité physique et la sédentarité avec les paramètres physiopathologiques de l'athérosclérose menant à la rupture de la plaque d'athérosclérose carotidienne afin d'apporter des éléments de réponse dans le but final de mettre en place une éventuelle thérapie par l'activité physique.

La première partie de ce travail a consisté en une étude de cohorte de l'occurrence de facteurs d'instabilité de la plaque carotidienne en fonction du niveau d'activité physique et de sédentarité quotidiens chez des patients asymptomatiques à risque d'AVC traités chirurgicalement. Cette première étude nous a permis de constater que l'activité physique régulière, en particulier lorsque l'on pratique plus de 900 MET-min/semaine, peut limiter l'occurrence de l'hémorragie intraplaque, le principal facteur d'instabilité de la plaque, alors que la sédentarité peut l'aggraver. En effet, nous avons observé une fréquence de plaques non-hémorragiques augmentée dans le tertile de patients les plus actifs (*vs* les moins actifs), et diminuée dans le tertile de patients les plus sédentaires (*vs* les moins sédentaires). Aucune relation entre l'occurrence de néovascularisation et des niveaux d'activité physique et de sédentarité n'a été constatée. Enfin, nous avons observé une fréquence de plaques avec une importante accumulation de macrophages diminuée chez les patients les plus actifs, même si la différence n'était pas significative. Cette première étude souligne l'importance de l'évaluation des niveaux d'activité physique et de sédentarité par les cliniciens afin d'inciter les patients asymptomatiques à élever leur niveau d'activité physique et dans le même temps réduire leur comportement sédentaire. Ainsi, ces données pourraient avoir un impact fort en termes de prévention primaire.

Parallèlement, cette étude nous a permis de confirmer les données de la littérature concernant l'impact de l'activité physique et de la sédentarité sur le stress oxydant dans le contexte de l'athérosclérose, en particulier dans une population homogène de patients

asymptomatiques avec plaques carotidiennes avancées. Ainsi, ces données semblent confirmer au niveau biologique, les effets néfastes de la sédentarité précédemment observés au regard de la santé cardiovasculaire (Gennuso et al. 2013).

L'observation de l'étude 1 quant à l'accumulation de macrophages nous a amené à nous intéresser spécifiquement aux aspects inflammatoires de la pathologie. Dans un premier temps, nous avons donc évalué l'implication de l'inflammation et l'immunité innée dans le processus de déstabilisation, indépendamment de l'activité physique et de la sédentarité (étude 2). Puis, dans un second temps, nous avons analysé ces aspects inflammatoires de la pathologie associés à l'activité physique et la sédentarité (étude 3). Ainsi, l'étude 2 nous a permis d'identifier l'axe CCL5/CCR5 comme étant majeur dans les dysfonctions du système immunitaire. En effet, la cytokine CCL5 était plus exprimée par les monocytes lorsque des PBMC étaient stimulés par le plasma de patients que par le plasma de sujets sains. Nous avons montré par la suite que CCL5 via son récepteur CCR5 favorisait l'activation de protéines impliquées dans les dysfonctions du système immunitaire, observées dans le contexte de l'athérosclérose carotidienne. L'étude 3 nous a permis, quant à elle, d'identifier la chimiokine GM-CSF, négativement associée à l'activité physique, comme pouvant moduler le phénotype des monocytes circulants. En effet, GM-CSF était moins exprimée dans le plasma de nos patients les plus actifs, et permettait une diminution du pourcentage de monocytes intermédiaires $CD14^{++}CD16^{+}$ et une augmentation du pourcentage de monocytes classiques $CD14^{++}CD16^{-}$. De plus, les patients les plus actifs présentaient une réponse monocytaire différente de celle des patients les plus sédentaires. Bien que préliminaire, cette étude nous offre des premiers éléments associant l'activité physique et la sédentarité et les aspects inflammatoires de l'athérosclérose.

Enfin, dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés aux paramètres hémodynamiques favorisant la rupture de plaque carotidienne (étude 4). A ce jour, peu

d'études se sont intéressées aux paramètres d'écoulement du sang dans les processus de déstabilisation et rupture de plaque carotidienne. Néanmoins, il nous a paru intéressant d'étudier cette relation étant donné l'implication de la pression artérielle dans l'initiation du développement de la plaque et des contraintes de cisaillement dans la rupture de la plaque. Les résultats de cette 4ème étude mettent en évidence une altération plus prononcée du profil hémorhéologique chez des patients symptomatiques vis-à-vis d'évènements ischémiques, par l'intermédiaire d'une augmentation de la viscosité sanguine favorisée par une hyper-agrégation des globules rouges. Et de façon intéressante, nous avons montré que la pratique d'activité physique modérée régulière était associée à une diminution de l'agrégation érythrocytaire observée chez les patients à risque d'AVC. Ainsi, cette dernière étude souligne l'importance de l'évaluation des paramètres hémorhéologiques par les cliniciens dans le diagnostic de l'athérosclérose ainsi que la promotion de l'activité physique comme potentielle thérapie, en vue d'améliorer la prévention primaire de patients asymptomatiques à risque d'AVC.

Ainsi, de manière générale, ce travail de thèse représente une première approche dans l'analyse des effets de l'activité physique sur les caractéristiques la plaque d'athérosclérose carotidienne et de son environnement pro-inflammatoire et pro-oxydant. En effet, nous avons vu à travers ces 4 études que l'activité physique avait un impact positif aussi bien sur des paramètres histologiques (avec la réduction de prévalence d'hémorragie intraplaque) que sur des paramètres systémiques (avec la réduction de molécules pro-oxydantes et pro-inflammatoires d'une part, et l'amélioration de propriétés d'écoulement sanguin d'autre part). Ainsi, l'activité physique pourrait, dans les années à venir, faire partie intégrante de la prise en charge thérapeutique des patients asymptomatiques avec plaques d'athérosclérose carotidiennes avancées.

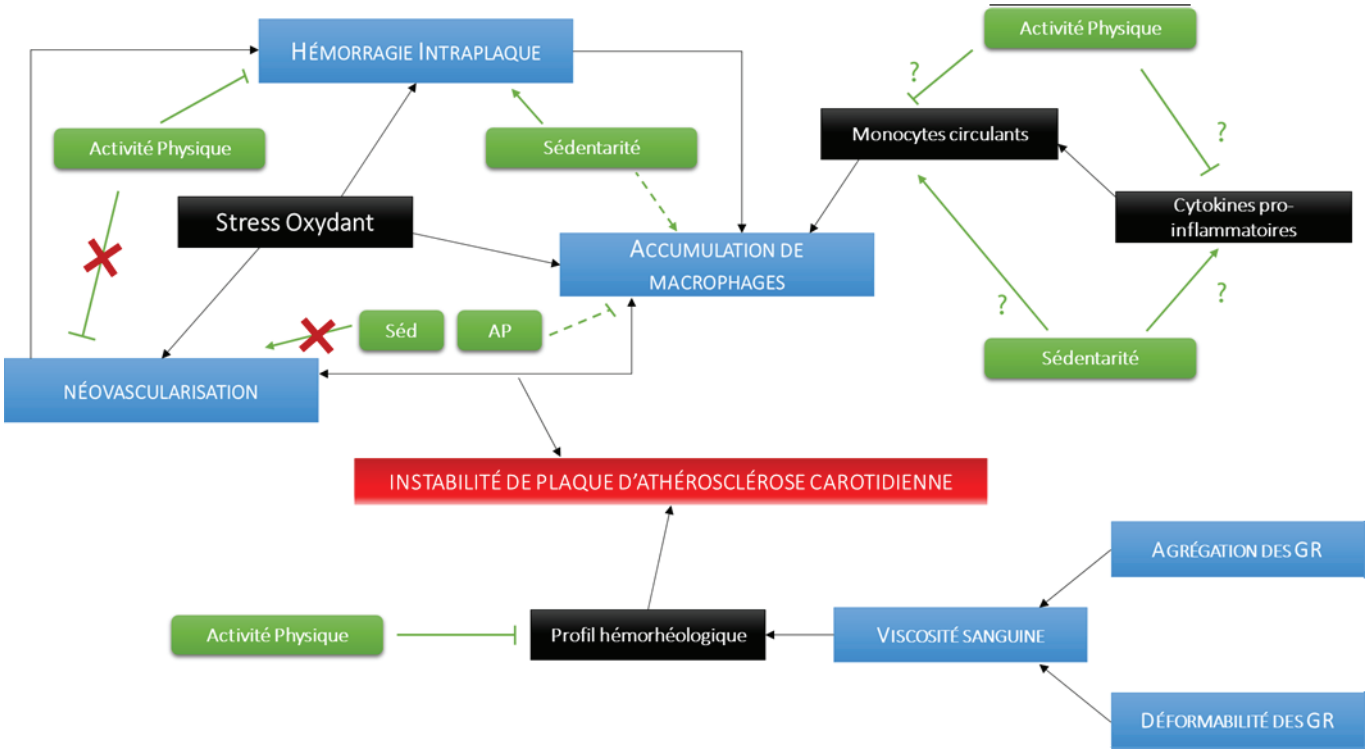


Figure 31. ***Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans les 4 études portant sur l'effet de l'activité physique et la sédentarité sur les facteurs d'instabilité de la plaque d'athérosclérose carotidienne***

PERSPECTIVES

De nos jours, l'intérêt porté à l'activité physique comme thérapie potentielle est grandissant, comme dans le traitement du cancer du sein métastatique où l'activité physique est au cœur du processus (Delrieu et al 2018). Néanmoins, dans le contexte de la prise en charge de patients asymptomatiques présentant des plaques d'athérosclérose, l'activité physique ne semble pas prioritaire à l'heure actuelle. En effet, jusqu'à présent, une grande majorité des patients asymptomatiques sont pris en charge chirurgicalement. Cependant, comme abordé précédement dans le manuscrit de thèse, la prise en considération plus systématique du ratio bénéfice/risque de la chirurgie d'endartériectomie entrainera dans un futur proche l'augmentation du nombre de patients non-éligibles à la chirurgie. Ainsi, il semble important d'apporter des éléments de réponse quant aux effets bénéfiques de l'activité physique sur les facteurs d'instabilité de la plaque d'athérosclérose

dans cette population de patients avec plaque carotidienne mais non-opérés. Les résultats de l'étude 1 constituent donc une première étape dans la justification d'intervention en activité physique des patients, permettant de valider l'hypothèse que l'activité physique limite la vulnérabilité de la plaque. Dans l'objectif final de la mise en place d'étude interventionnelle en activité phyique pour valider le ré-entrainement de ces patients comme approche thérapeutique, il semble important d'avoir un outil non-invasif d'évaluation des facteurs d'instabilité afin de suivre leur évolution dans le temps. Ainsi, nous avons mis en place une étude comparative de l'évaluation des facteurs d'instabilité par IRM de plaque carotidienne et analyse immunohistochimique, comme montré dans la littérature (den Hartog et al 2013), en fonction des niveaux d'activité physique et de sédentarité des patients asymptomatiques de notre cohorte. Dans un second temps, il est prévu de suivre longitudinalement la progression de la plaque à l'aide d'une analyse IRM d'une cohorte de patients non-opérés en fonction de leurs niveaux d'activité physique et de sédentarité (intégrés dans l'étude clinique ECST-2). Enfin, dans le même temps, nous allons mettre en place une étude axée sur des aspects psychologiques, en collaboration avec le laboratoire ACTé EA 4281 de l'Université Clermont Auvergne, afin de déterminer les éléments clés d'adhésion et de compliance à l'activité physique pour les patients et déterminer le type d'activité physique le plus adapté et le plus pérenne pour cette population. Ainsi, à plus long terme, nous aurons l'ensemble des élements pour mettre en place un programme adapté et efficace d'activité physique, permettant d'avoir un réel impact sur la prévention primaire de ces patients asymptomatiques non-éligibles à la chirurgie d'endartériectomie.

Les résultats de l'étude 2 fournissent des arguments sur l'implication d'une cytokine pro-inflammatoire et son récepteur dans la mise en place et l'entretien de l'inflammation systémique, l'activation de populations myéloïdes circulantes et également dans le façonnement de l'environnement immunitaire intraplaque par le recrutement et l'activation

de leucocytes. Ainsi, cette étude apporte de nouvelles informations quant à la contribution de l'axe CCL5/CCR5 dans la réponse immunitaire potentiellement impliquée dans l'hémorragie intraplaque et la déstabilisation de la plaque. Ainsi, l'identification du rôle délétère de cette cytokine dans le contexte de l'athérosclérose laisse suggérer que la mise en place d'immunothérapie ciblant CCL5 pourrait potentiellement rétablir la réponse immunitaire défaillante systémique et locale observée dans ce contexte. Il semble alors important dans un premier temps de confirmer ces résultats dans une population plus étendue, voire d'identifier d'autres cibles thérapeutiques globalement affectées dans l'athérosclérose. Puis, dans un second temps tester ces immunothérapies spécifiques chez l'animal, puis chez l'Homme.

De la même manière, l'étude 3 fournit des premiers éléments prometteurs quant à l'implication de l'activité physique dans les processus immunitaires liées à l'athérogénèse via la chimiokine GM-CSF. Bien qu'il soit nécessaire dans un premier temps de compléter cette étude avec notamment la confirmation du rôle de GM-CSF sur la polarisation des monocytes de patients asymptomatiques à risque d'AVC, les résultats préliminaires de cette étude offrent de nouvelles perspectives. En effet, tout comme CCL5, la mise en place d'immunothérapie ciblant GM-CSF pourrait être intéressante en termes de prévention primaire. De plus, il pourrait être également intéressant de tester l'interaction entre une immunothérapie ciblant GM-CSF (voire même CCL5) et un programme d'activité physique afin d'évaluer des effets potentialisateurs ou inhibiteurs de ces 2 possibles prises en charge thérapeutiques. Ainsi, l'approche mécanistique que nous avons adopté dans les études 2 et 3 et le modèle *in vitro* utilisé à cet effet paraissent pertinentes afin d'identifier des molécules cibles de thérapie médicamenteuse (telles que IL-1β dans l'essai clinique de Ridker et al. 2017) associées à l'activité physique ou la sédentarité.

PARTIE 5 –

BIBLIOGRAPHIE

- A -

Abela GS, Aziz K (2006) Cholesterol crystals rupture biological membranes and human plaques during acute cardiovascular events--a novel insight into plaque rupture by scanning electron microscopy. Scanning 28:1–10

Adachi T, Yamazaki N, Tasaki H, et al (1998) Changes in the heparin affinity of extracellular-superoxide dismutase in patients with coronary artery atherosclerosis. Biol Pharm Bull 21:1090–1093

Adamopoulos S, Parissis J, Kroupis C, et al (2001) Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. Eur Heart J 22:791–797. doi: 10.1053/euhj.2000.2285

Adams V, Linke A, Kränkel N, et al (2005) Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. Circulation 111:555–562. doi: 10.1161/01.CIR.0000154560.88933.7E

Agrotou S, Karatzi K, Papamichael C, et al (2013) Effects of chronic anaerobic training on markers of sub-clinical atherosclerosis. Hell J Cardiol HJC Hellēnikē Kardiologikē Epitheōrēsē 54:178–185

Ahmadsei M, Lievens D, Weber C, et al (2015) Immune-mediated and lipid-mediated platelet function in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 26:438–448. doi: 10.1097/MOL.0000000000000212

Ahn N, Kim K (2016) High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in cardiovascular disease: effect of exercise training. Integr Med Res 5:212–215. doi: 10.1016/j.imr.2016.07.001

Ajmani R, al. (2003) Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise. - PubMed - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Oxidative+stress+and+hemorheological+changes+induced+by+acute+treadmill+exercise. Accessed 26 Jan 2018

Akyildiz AC, Speelman L, Gijsen FJH (2014) Mechanical properties of human atherosclerotic intima tissue. J Biomech 47:773–783. doi: 10.1016/j.jbiomech.2014.01.019

Albert CM, Mittleman MA, Chae CU, et al (2000) Triggering of sudden death from cardiac causes by vigorous exertion. N Engl J Med 343:1355–1361. doi: 10.1056/NEJM200011093431902

Aloulou I, Varlet-Marie E, Mercier J, Brun J-F (2006) Hemorheologic effects of low intensity endurance training in sedentary patients suffering from the metabolic syndrome. Clin Hemorheol Microcirc 35:333–339

Amarenco P, Labreuche J, Lavallée P, Touboul P-J (2004) Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. Stroke 35:2902–2909. doi: 10.1161/01.STR.0000147965.52712.fa

Ambrose JA, Winters SL, Arora RR, et al (1985) Coronary angiographic morphology in myocardial infarction: a link between the pathogenesis of unstable angina and myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 6:1233–1238

Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P (1991) Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb J Vasc Biol 11:1223–1230

Amouyel P, Montaye M (1998) [Management of risk factors after coronary heart disease in European countries]. Rev Epidemiol Sante Publique 46:497–507

Anbazhagan K, Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F (2014) Transcriptomic network support distinct roles of classical and non-classical monocytes in human. Int Rev Immunol 33:470–489. doi: 10.3109/08830185.2014.902453

Anderssen SA, Hjelstuen AK, Hjermann I, et al (2005) Fluvastatin and lifestyle modification for reduction of carotid intima-media thickness and left ventricular mass progression in drug-treated hypertensives. Atherosclerosis 178:387–397. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.08.033

- B -

Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W (2002) The neutrophil NADPH oxidase. Arch Biochem Biophys 397:342–344. doi: 10.1006/abbi.2001.2642

Badimon L, Vilahur G (2014) Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. J Intern Med 276:618–632. doi: 10.1111/joim.12296

Baldus S, Köster R, Chumley P, et al (2005) Oxypurinol improves coronary and peripheral endothelial function in patients with coronary artery disease. Free Radic Biol Med 39:1184–1190. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.06.004

Bankoski A, Harris TB, McClain JJ, et al (2011) Sedentary activity associated with metabolic syndrome independent of physical activity. Diabetes Care 34:497–503. doi: 10.2337/dc10-0987

Barlic J, Murphy PM (2007) Chemokine regulation of atherosclerosis. J Leukoc Biol 82:226–236. doi: 10.1189/jlb.1206761

Barnett HJM, Meldrum HE, Eliasziw M, North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) collaborators (2002) The appropriate use of carotid endarterectomy. CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can 166:1169–1179

Bartfay W, Bartfay E (2014) A case-control study examining the effects of active versus sedentary lifestyles on measures of body iron burden and oxidative stress in postmenopausal women. Biol Res Nurs 16:38–45. doi: 10.1177/1099800413501717

Baskurt OK, Meiselman HJ (2003) Blood rheology and hemodynamics. Semin Thromb Hemost 29:435–450. doi: 10.1055/s-2003-44551

Baskurt OK, Meiselman HJ (2010) Le phénomène d'agrégation érythrocytaire : de nouvelles découvertes. Sang Thromb Vaiss 22:137–143. doi: 10.1684/stv.2010.0466

Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, et al (2002) The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. J Immunol Baltim Md 1950 168:3536–3542

Beloqui O, Moreno MU, San José G, et al (2017) Increased phagocytic NADPH oxidase activity associates with coronary artery calcification in asymptomatic men. Free Radic Res 51:389–396. doi: 10.1080/10715762.2017.1321745

Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al (2017) Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation 135:e146–e603. doi: 10.1161/CIR.0000000000000485

Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L, et al (2012) Elevated CD14++CD16- monocytes predict cardiovascular events. Circ Cardiovasc Genet 5:122–131. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.960385

Berlin JA, Colditz GA (1990) A Meta-Analysis of Physical Activity in the Prevention of Coronary Heart Disease. Am J Epidemiol 132:612–628

Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM, et al (2006) International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. JAMA 295:180–189. doi: 10.1001/jama.295.2.180

Biswas A, Oh PI, Faulkner GE, et al (2015) Sedentary time and its association with risk for disease incidence, mortality, and hospitalization in adults: a systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med 162:123–132. doi: 10.7326/M14-1651

Bjork L, Jenkins NT, Witkowski S, Hagberg JM (2012) Nitro-oxidative stress biomarkers in active and inactive men. Int J Sports Med 33:279–284. doi: 10.1055/s-0032-1301891

Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH (2008) Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. Gend Med 5:218–228. doi: 10.1016/j.genm.2008.07.002

Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, et al (2008) Atherosclerosis and oxidative stress. Histol Histopathol 23:381–390. doi: 10.14670/HH-23.381

Borriello F, Iannone R, Di Somma S, et al (2016) GM-CSF and IL-3 Modulate Human Monocyte TNF-α Production and Renewal inIn VitroModels of Trained Immunity. Front Immunol 7:680. doi: 10.3389/fimmu.2016.00680

Böthig S (1989) WHO MONICA Project: objectives and design. Int J Epidemiol 18:S29-37

Bots ML, Baldassarre D, Simon A, et al (2007) Carotid intima-media thickness and coronary atherosclerosis: weak or strong relations? Eur Heart J 28:398–406. doi: 10.1093/eurheartj/ehl482

Bourdillon MC, Poston RN, Covacho C, et al (2000) ICAM-1 deficiency reduces atherosclerotic lesions in double-knockout mice (ApoE(-/-)/ICAM-1(-/-)) fed a fat or a chow diet. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:2630–2635

Bouzid MA, Hammouda O, Matran R, et al (2014) Low intensity aerobic exercise and oxidative stress markers in older adults. J Aging Phys Act 22:536–542. doi: 10.1123/japa.2013-0037

Bouzid MA, Hammouda O, Matran R, et al (2015) Influence of physical fitness on antioxidant activity and malondialdehyde level in healthy older adults. Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab 40:582–589. doi: 10.1139/apnm-2014-0417

Bowles DK, Laughlin MH (2011) Mechanism of beneficial effects of physical activity on atherosclerosis and coronary heart disease. J Appl Physiol 111:308–310. doi: 10.1152/japplphysiol.00634.2011

Bowry AD, Brookhart MA, Choudhry NK (2008) Meta-Analysis of the Efficacy and Safety of Clopidogrel Plus Aspirin as Compared to Antiplatelet Monotherapy for the Prevention of Vascular Events. Am J Cardiol 101:960–966

Breneman CB, Polinski K, Sarzynski MA, et al (2016) The Impact of Cardiorespiratory Fitness Levels on the Risk of Developing Atherogenic Dyslipidemia. Am J Med 129:1060–1066. doi: 10.1016/j.amjmed.2016.05.017

Brenes G, Dearwater S, Shapera R, et al (1986) High density lipoprotein cholesterol concentrations in physically active and sedentary spinal cord injured patients. Arch Phys Med Rehabil 67:445–450

Brott TG, Halperin JL, Abbara S, et al (2011) 2011 ASA/ACCF/AHA/AANN/AANS/ACR/ASNR/CNS/SAIP/SCAI/SIR/SNIS/SVM/SVS guideline on the management of patients with extracranial carotid and vertebral artery disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and the American Stroke Association, American Association of Neuroscience Nurses, American Association of Neurological Surgeons, American College of Radiology, American Society of Neuroradiology, Congress of Neurological Surgeons, Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of NeuroInterventional Surgery, Society for Vascular Medicine, and Society for Vascular Surgery. J Am Coll Cardiol 57:e16-94. doi: 10.1016/j.jacc.2010.11.006

Brun JF, Khaled S, Raynaud E, et al (1998) The triphasic effects of exercise on blood rheology: which relevance to physiology and pathophysiology? Clin Hemorheol Microcirc 19:89–104

Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, et al (2005) Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. Cell Metab 1:409–414. doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.002

Bryk D, Olejarz W, Zapolska-Downar D (2017) The role of oxidative stress and NADPH oxidase in the pathogenesis of atherosclerosis. Postepy Hig Med Doswiadczalnej Online 71:57–68. doi: 10.5604/17322693.1229823

Buczyński A, Wachowicz B, Kedziora-Kornatowska K, et al (1993) Changes in antioxidant enzymes activities, aggregability and malonyldialdehyde concentration in blood platelets from patients with coronary heart disease. Atherosclerosis 100:223–228

Burke AP, Farb A, Malcom GT, et al (1999) Plaque rupture and sudden death related to exertion in men with coronary artery disease. JAMA 281:921–926

Burke AP, Farb A, Malcom GT, et al (1997) Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. N Engl J Med 336:1276–1282. doi: 10.1056/NEJM199705013361802

Butcovan D, Mocanu V, Baran D, et al (2016) Assessment of vulnerable and unstable carotid atherosclerotic plaques on endarterectomy specimens. Exp Ther Med 11:2028–2032. doi: 10.3892/etm.2016.3096

- C -

Callegari A, Liu Y, White CC, et al (2011) Gain and loss of function for glutathione synthesis: impact on advanced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 31:2473–2482. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.229765

Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, et al (2015) Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. N Engl J Med 372:2387–2397. doi: 10.1056/NEJMoa1410489

CAPRIE Steering Committee (1996) A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. Lancet Lond Engl 348:1329–1339

Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, et al (1997) Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. Hypertension 30:57–63

Carocho M, Ferreira ICFR (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc 51:15–25. doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021

Carr AC, McCall MR, Frei B (2000) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:1716–1723

Carter S, Hartman Y, Holder S, et al (2017) Sedentary Behavior and Cardiovascular Disease Risk: Mediating Mechanisms. Exerc Sport Sci Rev 45:80–86. doi: 10.1249/JES.0000000000000106

Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM (1985) Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. Public Health Rep Wash DC 1974 100:126–131

Cathcart MK, Morel DW, Chisolm GM (1985) Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. J Leukoc Biol 38:341–350

Cesari F, Marcucci R, Gori AM, et al (2013) Impact of a cardiac rehabilitation program and inflammatory state on endothelial progenitor cells in acute coronary syndrome patients. Int J Cardiol 167:1854–1859. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.04.157

Chan CP, Jiang H, Leung L, et al (2012) Multiple atherosclerosis-related biomarkers associated with short- and long-term mortality after stroke. Clin Biochem 45:1308–1315. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.06.014

Chan SY, Mancini GBJ, Burns S, et al (2006) Dietary measures and exercise training contribute to improvement of endothelial function and atherosclerosis even in patients given intensive pharmacologic therapy. J Cardpulm Rehabil 26:288–293

Cheng C, Tempel D, van Haperen R, et al (2006) Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. Circulation 113:2744–2753. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.590018

Chirico EN, Di Cataldo V, Chauveau F, et al (2016) Magnetic resonance imaging biomarkers of exercise-induced improvement of oxidative stress and inflammation in the brain of old high-fat-fed ApoE(-/-) mice. J Physiol 594:6969–6985. doi: 10.1113/JP271903

Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV (2015) Contribution of neovascularization and intraplaque haemorrhage to atherosclerotic plaque progression and instability. Acta Physiol Oxf Engl 213:539–553. doi: 10.1111/apha.12438

Chiu J-J, Chien S (2011) Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. Physiol Rev 91:327–387. doi: 10.1152/physrev.00047.2009

Chiu J-J, Lee P-L, Chen C-N, et al (2004) Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selectin expressions induced by tumor necrosis factor-[alpha] in endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:73–79. doi: 10.1161/01.ATV.0000106321.63667.24

Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, Mihaylova B, Emberson J, et al (2012) The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. Lancet Lond Engl 380:581–590. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60367-5

Christ A, Bekkering S, Latz E, Riksen NP (2016) Long-term activation of the innate immune system in atherosclerosis. Semin Immunol 28:384–393. doi: 10.1016/j.smim.2016.04.004

Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, et al (2007) Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. The Lancet 370:1706–1713. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61721-8

Chuaiphichai S, Crabtree MJ, Mcneill E, et al (2017) A key role for tetrahydrobiopterin-dependent endothelial NOS regulation in resistance arteries: studies in endothelial cell tetrahydrobiopterin-deficient mice. Br J Pharmacol 174:657–671. doi: 10.1111/bph.13728

Church TS, Lavie CJ, Milani RV, Kirby GS (2002) Improvements in blood rheology after cardiac rehabilitation and exercise training in patients with coronary heart disease. Am Heart J 143:349–355

Cicha I, Wörner A, Urschel K, et al (2011) Carotid plaque vulnerability: a positive feedback between hemodynamic and biochemical mechanisms. Stroke J Cereb Circ 42:3502–3510. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.627265

Cid MC, Cebrián M, Font C, et al (2000) Cell adhesion molecules in the development of inflammatory infiltrates in giant cell arteritis: inflammation-induced angiogenesis as the preferential site of leukocyte-endothelial cell interactions. Arthritis Rheum 43:184–194. doi: 10.1002/1529-0131(200001)43:1<184::AID-ANR23>3.0.CO;2-N

Cipollone F, Iezzi A, Fazia M, et al (2003) The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. Circulation 108:1070–1077. doi: 10.1161/01.CIR.0000086014.80477.0D

Clarkson PM, Thompson HS (2000) Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? Am J Clin Nutr 72:637S–46S

Cleland CL, Hunter RF, Kee F, et al (2014) Validity of the global physical activity questionnaire (GPAQ) in assessing levels and change in moderate-vigorous physical activity and sedentary behaviour. BMC Public Health 14:1255. doi: 10.1186/1471-2458-14-1255

Clinton SK, Underwood R, Hayes L, et al (1992) Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. Am J Pathol 140:301–316

Coelho Junior HJ, Gambassi BB, Diniz TA, et al (2016) Inflammatory Mechanisms Associated with Skeletal Muscle Sequelae after Stroke: Role of Physical Exercise. Mediators Inflamm 2016:3957958. doi: 10.1155/2016/3957958

Collins RG, Velji R, Guevara NV, et al (2000) P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. J Exp Med 191:189–194

Connes P, Alexy T, Detterich J, et al (2016) The role of blood rheology in sickle cell disease. Blood Rev 30:111–118. doi: 10.1016/j.blre.2015.08.005

Connes P, Boisseau MR (2010) Hémorhéologie. Sang Thromb Vaiss 22:126–136. doi: 10.1684/stv.2010.0464

Connes P, Simmonds MJ, Brun J-F, Baskurt OK (2013) Exercise hemorheology: classical data, recent findings and unresolved issues. Clin Hemorheol Microcirc 53:187–199. doi: 10.3233/CH-2012-1643

Connes P, Tripette J, Mukisi-Mukaza M, et al (2009) Relationships between hemodynamic, hemorheological and metabolic responses during exercise. Biorheology 46:133–143. doi: 10.3233/BIR-2009-0529

Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, et al (2003) Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. Eur Heart J 24:987–1003

Corson MA, James NL, Latta SE, et al (1996) Phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Response to Fluid Shear Stress. Circ Res 79:984–991. doi: 10.1161/01.RES.79.5.984

Cosentino F, Hürlimann D, Delli Gatti C, et al (2008) Chronic treatment with tetrahydrobiopterin reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in hypercholesterolaemia. Heart Br Card Soc 94:487–492. doi: 10.1136/hrt.2007.122184

Cros J, Cagnard N, Woollard K, et al (2010) Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. Immunity 33:375–386. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.012

Crouse SF, O'Brien BC, Grandjean PW, et al (1997) Effects of Training and a Single Session of Exercise on Lipids and Apolipoproteins in Hypercholesterolemic Men. J Appl Physiol 83:2019–2028

Crum RM, Anthony JC, Bassett SS, Folstein MF (1993) Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and educational level. JAMA 269:2386–2391

Cunningham KS, Gotlieb AI (2005) The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. Lab Investig J Tech Methods Pathol 85:9–23. doi: 10.1038/labinvest.3700215

Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al (2001) A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. J Clin Invest 107:1255–1262. doi: 10.1172/JCI11871

- $\mathcal{D}$ -

Danaei G, Ding EL, Mozaffarian D, et al (2009) The Preventable Causes of Death in the United States: Comparative Risk Assessment of Dietary, Lifestyle, and Metabolic Risk Factors. PLoS Med 6:. doi: 10.1371/journal.pmed.1000058

Dansky HM, Barlow CB, Lominska C, et al (2001) Adhesion of Monocytes to Arterial Endothelium and Initiation of Atherosclerosis Are Critically Dependent on Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Gene Dosage. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21:1662–1667. doi: 10.1161/hq1001.096625

Dasu MR, Devaraj S, Jialal I (2007) High glucose induces IL-1beta expression in human monocytes: mechanistic insights. Am J Physiol Endocrinol Metab 293:E337-346. doi: 10.1152/ajpendo.00718.2006

Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. Biochem Biophys Res Commun 107:1198–1205

Davies PF (2009) Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 6:16–26. doi: 10.1038/ncpcardio1397

de Winther MP, van Dijk KW, Havekes LM, Hofker MH (2000) Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:290–297

Del Ben M, Fabiani M, Loffredo L, et al (2012) Oxidative stress mediated arterial dysfunction in patients with obstructive sleep apnoea and the effect of continuous positive airway pressure treatment. BMC Pulm Med 12:36. doi: 10.1186/1471-2466-12-36

Delaney CL, Spark JI (2016) A randomised controlled trial of two supervised exercise regimens and their impact on inflammatory burden in patients with intermittent claudication. Vascular 24:264–272. doi: 10.1177/1708538115617622

Della-Morte D, Rundek T (2015) The role of shear stress and arteriogenesis in maintaining vascular homeostasis and preventing cerebral atherosclerosis. Brain Circ 1:53. doi: 10.4103/2394-8108.164993

Demeure F, Bouzin C, Roelants V, et al (2017) Head-to-Head Comparison of Inflammation and Neovascularization in Human Carotid Plaques: Implications for the Imaging of Vulnerable Plaques. Circ Cardiovasc Imaging 10:. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.116.005846

Den Ruijter HM, Peters SAE, Anderson TJ, et al (2012) Common carotid intima-media thickness measurements in cardiovascular risk prediction: a meta-analysis. JAMA 308:796–803. doi: 10.1001/jama.2012.9630

Desai MY, Nasir K, Rumberger JA, et al (2004) Relation of degree of physical activity to coronary artery calcium score in asymptomatic individuals with multiple metabolic risk factors. Am J Cardiol 94:729–732. doi: 10.1016/j.amjcard.2004.06.004

Després J-P, Golay A, Sjöström L (2005) Effects of Rimonabant on Metabolic Risk Factors in Overweight Patients with Dyslipidemia. N Engl J Med 353:2121–2134. doi: 10.1056/NEJMoa044537

Devereux RB, Case DB, Alderman MH, et al (2000) Possible role of increased blood viscosity in the hemodynamics of systemic hypertension. Am J Cardiol 85:1265–1268

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. J Hypertens 18:655–673

Diaw M, Diop S, Soubaiga FYW, et al (2015) Blood viscosity is lower in trained than in sedentary sickle cell trait carriers. Clin Hemorheol Microcirc 61:23–29. doi: 10.3233/CH-141852

Diaz KM, Booth JN, Seals SR, et al (2016) Sedentary behavior and subclinical atherosclerosis in African Americans: cross-sectional analysis of the Jackson heart study. Int J Behav Nutr Phys Act 13:31. doi: 10.1186/s12966-016-0349-y

Dickhout JG, Hossain GS, Pozza LM, et al (2005) Peroxynitrite Causes Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Human Vascular Endothelium Implications in Atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:2623–2629. doi: 10.1161/01.ATV.0000189159.96900.d9

Dickie K, Micklesfield LK, Chantler S, et al (2014) Meeting physical activity guidelines is associated with reduced risk for cardiovascular disease in black South African women; a 5.5-year follow-up study. BMC Public Health 14:498. doi: 10.1186/1471-2458-14-498

Dintenfass L (1989) Modifications of blood rheology during aging and age-related pathological conditions. Aging Milan Italy 1:99–125

Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, et al (1998) The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. J Clin Invest 102:145–152. doi: 10.1172/JCI3001

Dopheide JF, Scheer M, Doppler C, et al (2015) Change of walking distance in intermittent claudication: impact on inflammation, oxidative stress and mononuclear cells: a pilot study. Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc 104:751–763. doi: 10.1007/s00392-015-0840-5

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. Nature 464:1357–1361. doi: 10.1038/nature08938

Dunmore BJ, McCarthy MJ, Naylor AR, Brindle NPJ (2007) Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques. J Vasc Surg 45:155–159. doi: 10.1016/j.jvs.2006.08.072

Dushkin MI (2012) Macrophage/foam cell is an attribute of inflammation: mechanisms of formation and functional role. Biochem Biokhimiia 77:327–338. doi: 10.1134/S0006297912040025

- $\mathcal{E}$ -

Ebrahim S, Papacosta O, Whincup P, et al (1999) Carotid plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors, and prevalent cardiovascular disease in men and women: the British Regional Heart Study. Stroke J Cereb Circ 30:841–850

Ed Rainger G, Chimen M, Harrison MJ, et al (2015) The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. Platelets 26:507–520. doi: 10.3109/09537104.2015.1064881

Edwards MK, Rhodes RE, Mann JR, Loprinzi PD (2018) Effects of acute aerobic exercise or meditation on emotional regulation. Physiol Behav. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.12.037

Eijsvogels TMH, Fernandez AB, Thompson PD (2016) Are There Deleterious Cardiac Effects of Acute and Chronic Endurance Exercise? Physiol Rev 96:99–125. doi: 10.1152/physrev.00029.2014

Elosua R, Molina L, Fito M, et al (2003a) Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. Atherosclerosis 167:327–334

Elosua R, Molina L, Fito M, et al (2003b) Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. Atherosclerosis 167:327–334

Ernst E (1995) Haemorheological consequences of chronic cigarette smoking. J Cardiovasc Risk 2:435–439

Ernst E (1987) Influence of regular physical activity on blood rheology. Eur Heart J 8 Suppl G:59–62

Ernst EE, Matrai A (1987) Intermittent claudication, exercise, and blood rheology. Circulation 76:1110–1114

Ewart M-A, Kennedy S, Macmillan D, et al (2014) Altered vascular smooth muscle function in the ApoE knockout mouse during the progression of atherosclerosis. Atherosclerosis 234:154–161. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.02.014

Exner M, Minar E, Mlekusch W, et al (2006) Myeloperoxidase predicts progression of carotid stenosis in states of low high-density lipoprotein cholesterol. J Am Coll Cardiol 47:2212–2218. doi: 10.1016/j.jacc.2006.01.067

- *F* -

Faber JE, Chilian WM, Deindl E, et al (2014) A brief etymology of the collateral circulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 34:1854–1859. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303929

Fang X, Weintraub NL, Rios CD, et al (1998) Overexpression of human superoxide dismutase inhibits oxidation of low-density lipoprotein by endothelial cells. Circ Res 82:1289–1297

Farah BQ, Ritti-Dias RM, Montgomery PS, et al (2016) Sedentary behavior is associated with impaired biomarkers in claudicants. J Vasc Surg 63:657–663. doi: 10.1016/j.jvs.2015.09.018

Farley AC, Hajek P, Lycett D, Aveyard P (2012) Interventions for preventing weight gain after smoking cessation. Cochrane Database Syst Rev 1:CD006219. doi: 10.1002/14651858.CD006219.pub3

Farquharson CAJ, Butler R, Hill A, et al (2002) Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. Circulation 106:221–226

Favier A (2006) [Oxidative stress in human diseases]. Ann Pharm Fr 64:390–396

Fayad ZA, Fuster V (2001) Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. Circ Res 89:305–316

Ferrara N (2009) Vascular endothelial growth factor. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29:789–791. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179663

Ferreira I, Twisk JWR, Stehouwer CDA, et al (2003) Longitudinal changes in .VO2max: associations with carotid IMT and arterial stiffness. Med Sci Sports Exerc 35:1670–1678. doi: 10.1249/01.MSS.0000089247.37563.4B

Fisher-Wellman K, Bloomer RJ (2009) Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. Dyn Med DM 8:1. doi: 10.1186/1476-5918-8-1

Fleiner M, Kummer M, Mirlacher M, et al (2004) Arterial neovascularization and inflammation in vulnerable patients: early and late signs of symptomatic

atherosclerosis. Circulation 110:2843–2850. doi: 10.1161/01.CIR.0000146787.16297.E8

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) “Mini-mental state”. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatr Res 12:189–198

Forbes C, Quek RGW, Deshpande S, et al (2016) Relationship between changes in coronary atherosclerotic plaque burden measured by intravascular ultrasound and cardiovascular disease outcomes: a systematic literature review. Curr Med Res Opin 32:1143–1150. doi: 10.1185/03007995.2016.1162775

Ford ES (2002) Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among U.S. adults. Epidemiol Camb Mass 13:561–568. doi: 10.1097/01.EDE.0000023965.92535.C0

Ford ES, Kohl HW, Mokdad AH, Ajani UA (2005) Sedentary behavior, physical activity, and the metabolic syndrome among U.S. adults. Obes Res 13:608–614. doi: 10.1038/oby.2005.65

Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J 33:829–837, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304

Förstermann U, Xia N, Li H (2017) Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. Circ Res 120:713–735. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326

Forsyth AM, Braunmüller S, Wan J, et al (2012) The effects of membrane cholesterol and simvastatin on red blood cell deformability and ATP release. Microvasc Res 83:347–351. doi: 10.1016/j.mvr.2012.02.004

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Mol Cell Biol 16:4604–4613

Fowkes FG, Lowe GD, Rumley A, et al (1993) The relationship between blood viscosity and blood pressure in a random sample of the population aged 55 to 74 years. Eur Heart J 14:597–601

Fraile-Bermúdez AB, Kortajarena M, Zarrazquin I, et al (2015) Relationship between physical activity and markers of oxidative stress in independent community-living elderly individuals. Exp Gerontol 70:26–31. doi: 10.1016/j.exger.2015.07.005

Francisco-Cruz A, Aguilar-Santelises M, Ramos-Espinosa O, et al (2014) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. Med Oncol Northwood Lond Engl 31:774. doi: 10.1007/s12032-013-0774-6

- G -

Gabay C, Kushner I (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med 340:448–454. doi: 10.1056/NEJM199902113400607

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P (1994) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. J Clin Invest 94:2493–2503. doi: 10.1172/JCI117619

Gao P, Chen Z, Bao Y, et al (2007) Correlation between carotid intraplaque hemorrhage and clinical symptoms: systematic review of observational studies. Stroke J Cereb Circ 38:2382–2390. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.482760

García-Hermoso A, Notario-Pacheco B, Recio-Rodríguez JI, et al (2015) Sedentary behaviour patterns and arterial stiffness in a Spanish adult population – The EVIDENT trial. Atherosclerosis 243:516–522. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.004

Gardner AW, Montgomery PS, Casanegra AI, et al (2016) Association between gait characteristics and endothelial oxidative stress and inflammation in patients with symptomatic peripheral artery disease. Age Dordr Neth 38:64. doi: 10.1007/s11357-016-9925-y

Gardner AW, Montgomery PS, Zhao YD, et al (2017) Association between daily walking and antioxidant capacity in patients with symptomatic peripheral artery disease. J Vasc Surg 65:1762–1768. doi: 10.1016/j.jvs.2016.12.108

Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, et al (1998) Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. Circulation 98:1164–1171

GBD 2013 Risk Factors Collaborators, Forouzanfar MH, Alexander L, et al (2015) Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet Lond Engl 386:2287–2323. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00128-2

Geeraerts X, Bolli E, Fendt S-M, Van Ginderachter JA (2017) Macrophage Metabolism As Therapeutic Target for Cancer, Atherosclerosis, and Obesity. Front Immunol 8:289. doi: 10.3389/fimmu.2017.00289

Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity 19:71–82

Gennuso KP, Gangnon RE, Matthews CE, et al (2013) Sedentary behavior, physical activity, and markers of health in older adults. Med Sci Sports Exerc 45:1493–1500. doi: 10.1249/MSS.0b013e318288a1e5

George J, Carr E, Davies J, et al (2006) High-dose allopurinol improves endothelial function by profoundly reducing vascular oxidative stress and not by lowering uric acid. Circulation 114:2508–2516. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.651117

Ghiadoni L, Sudano I, Versari D, et al (2002) P-506: Correlation between oxidative stress and arterial blood pressure. Am J Hypertens 15:216A-216A. doi: 10.1016/S0895-7061(02)02857-1

Giallauria F, Palomba S, De Sio I, et al (2009) Inflammatory markers and visceral fat are inversely associated with maximal oxygen consumption in women with polycystic

ovary syndrome (PCOS). Clin Endocrinol (Oxf) 70:394–400. doi: 10.1111/j.1365-2265.2008.03336.x

Gielen S, Sandri M, Erbs S, Adams V (2011) Exercise-induced modulation of endothelial nitric oxide production. Curr Pharm Biotechnol 12:1375–1384

Gieseg SP, Amit Z, Yang Y-T, et al (2010) Oxidant production, oxLDL uptake, and CD36 levels in human monocyte–derived macrophages are downregulated by the macrophage-generated antioxidant 7,8-dihydroneopterin. Antioxid Redox Signal 13:1525–1534. doi: 10.1089/ars.2009.3065

Gimbrone MA (1999) Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. Thromb Haemost 82:722–726

Gisterå A, Hansson GK (2017) The immunology of atherosclerosis. Nat Rev Nephrol 13:368–380. doi: 10.1038/nrneph.2017.51

Gisterå A, Robertson A-KL, Andersson J, et al (2013) Transforming growth factor-β signaling in T cells promotes stabilization of atherosclerotic plaques through an interleukin-17-dependent pathway. Sci Transl Med 5:196ra100. doi: 10.1126/scitranslmed.3006133

Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, et al (2011) The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. Nat Rev Immunol 11:607–615. doi: 10.1038/nri3041

Gleissner CA, von Hundelshausen P, Ley K (2008) Platelet chemokines in vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 28:1920–1927. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.169417

Go Y-M, Patel RP, Maland MC, et al (1999) Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase. Am J Physiol - Heart Circ Physiol 277:H1647–H1653

Godiska R, Chantry D, Raport CJ, et al (1997) Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. J Exp Med 185:1595–1604

Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH (2000) The symptomatic carotid plaque. Stroke J Cereb Circ 31:774–781

Gong Z, Xing S, Zheng F, Xing Q (2015) Increased expression of macrophage migration inhibitory factor in aorta of patients with coronary atherosclerosis. J Cardiovasc Surg (Torino) 56:631–637

Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity 32:593–604. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007

Gori N, Anania G, Stefani L, et al (2015) Carotid Intima-Media Thickness in Master Athletes. Asian J Sports Med 6:. doi: 10.5812/asjsm.6(2)2015.22587

Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW (2006a) Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. J Clin Invest 116:59–69. doi: 10.1172/JCI25074

Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW (2006b) Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. J Clin Invest 116:59–69. doi: 10.1172/JCI25074

Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC, Böttinger EP (2000) Dietary fat and reduced levels of TGFbeta1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions. J Cell Sci 113 (Pt 13):2355–2361

Greene NP, Martin SE, Crouse SF (2012) Acute Exercise and Training Alter Blood Lipid and Lipoprotein Profiles Differently in Overweight and Obese Men and Women. Obes Silver Spring Md. doi: 10.1038/oby.2012.65

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circ Res 86:494–501

Grip O, Bredberg A, Lindgren S, Henriksson G (2007) Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 13:566–572. doi: 10.1002/ibd.20025

Gross MD, Bielinski SJ, Suarez-Lopez JR, et al (2012) Circulating soluble intercellular adhesion molecule 1 and subclinical atherosclerosis: the coronary artery risk development in young adults study. Clin Chem 58:411–420. doi: 10.1373/clinchem.2011.168559

Grosse GM, Schulz-Schaeffer WJ, Teebken OE, et al (2016) Monocyte Subsets and Related Chemokines in Carotid Artery Stenosis and Ischemic Stroke. Int J Mol Sci 17:433. doi: 10.3390/ijms17040433

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. Nature 320:454–456. doi: 10.1038/320454a0

Guinchard-Foulon E, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R (2003) HDL-cholestérol : place de son dosage dans l'évaluation d'un risque cardiovasculaire. Ann Biol Clin (Paris) 61:549–556

Gutteridge JM, Halliwell B (1990) Reoxygenation injury and antioxidant protection: a tale of two paradoxes. Arch Biochem Biophys 283:223–226

Guzik TJ, West NEJ, Black E, et al (2000) Vascular Superoxide Production by NAD(P)H Oxidase: Association With Endothelial Dysfunction and Clinical Risk Factors. Circ Res 86:e85–e90. doi: 10.1161/01.RES.86.9.e85

- ℋ -

Haapanen-Niemi N, Miilunpalo S, Pasanen M, et al (2000) Body mass index, physical inactivity and low level of physical fitness as determinants of all-cause and cardiovascular disease mortality--16 y follow-up of middle-aged and elderly men and women. Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes 24:1465–1474

Haber F, Weiss J (1934) The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts. Proc R Soc Lond Math Phys Eng Sci 147:332–351. doi: 10.1098/rspa.1934.0221

Häkkinen T, Karkola K, Ylä-Herttuala S (2000) Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes of oxidized low-density lipoprotein, scavenger receptor, and CD16 (Fc gammaRIII). Virchows Arch Int J Pathol 437:396–405

Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. Lancet Lond Engl 1:1396–1397

Hambrecht R, Adams V, Erbs S, et al (2003) Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. Circulation 107:3152–3158. doi: 10.1161/01.CIR.0000074229.93804.5C

Hambrecht R, Walther C, Möbius-Winkler S, et al (2004) Percutaneous coronary angioplasty compared with exercise training in patients with stable coronary artery disease: a randomized trial. Circulation 109:1371–1378. doi: 10.1161/01.CIR.0000121360.31954.1F

Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, et al (2000a) Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. N Engl J Med 342:454–460. doi: 10.1056/NEJM200002173420702

Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, et al (2000b) Effect of Exercise on Coronary Endothelial Function in Patients with Coronary Artery Disease. N Engl J Med 342:454–460. doi: 10.1056/NEJM200002173420702

Hamer M, Sabia S, Batty GD, et al (2012) Physical activity and inflammatory markers over 10 years: follow-up in men and women from the Whitehall II cohort study. Circulation 126:928–933. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.103879

Hansson GK, Libby P (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. Nat Rev Immunol 6:508–519. doi: 10.1038/nri1882

Hartmann P, Schober A, Weber C (2015) Chemokines and microRNAs in atherosclerosis. Cell Mol Life Sci CMLS 72:3253–3266. doi: 10.1007/s00018-015-1925-z

HAS (2013) 10IRP04_reco_Diabete_type_2 - 10irp04_reco_diabete_type_2.pdf. https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-02/10irp04_reco_diabete_type_2.pdf. Accessed 4 May 2017

Haskell WL, Lee I-M, Pate RR, et al (2007) Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. Med Sci Sports Exerc 39:1423–1434. doi: 10.1249/mss.0b013e3180616b27

Haute Autorité de Santé (2015) Prévention Vasculaire après un infarctus cérébral ou un accident ischémique transitoire

He F, Li J, Liu Z, et al (2016) Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Exercise. Front Physiol 7:486. doi: 10.3389/fphys.2016.00486

Healy GN, Matthews CE, Dunstan DW, et al (2011) Sedentary time and cardio-metabolic biomarkers in US adults: NHANES 2003-06. Eur Heart J 32:590–597. doi: 10.1093/eurheartj/ehq451

Helgason CM, Wolf PA (1997) American Heart Association Prevention Conference IV: Prevention and Rehabilitation of Stroke: Executive Summary. Circulation 96:701–707. doi: 10.1161/01.CIR.96.2.701

Henke PK, DeBrunye LA, Strieter RM, et al (2000) Viral IL-10 gene transfer decreases inflammation and cell adhesion molecule expression in a rat model of venous thrombosis. J Immunol Baltim Md 1950 164:2131–2141

Henle ES, Luo Y, Gassmann W, Linn S (1996) Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxyguanosine family. J Biol Chem 271:21177–21186

Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, et al (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. Nature 391:591–594. doi: 10.1038/35393

Herbert PN, Bernier DN, Cullinane EM, et al (1984) High-density lipoprotein metabolism in runners and sedentary men. JAMA J Am Med Assoc 252:1034–1037

Herisson F, Heymann M-F, Chétiveaux M, et al (2011) Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. Atherosclerosis 216:348–354. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.004

Hierso R, Waltz X, Mora P, et al (2014) Effects of oxidative stress on red blood cell rheology in sickle cell patients. Br J Haematol 166:601–606. doi: 10.1111/bjh.12912

Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, et al (2002) Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. Am J Hypertens 15:326–332

Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, et al (2006) Tetrahydrobiopterin improves aging-related impairment of endothelium-dependent vasodilation through increase in nitric oxide production. Atherosclerosis 186:390–395. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.07.025

Higashi Y, Yoshizumi M (2004) Exercise and endothelial function: Role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. Pharmacol Ther 102:87–96. doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.02.003

Honda O, Sugiyama S, Kugiyama K, et al (2004) Echolucent carotid plaques predict future coronary events in patients with coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 43:1177–1184. doi: 10.1016/j.jacc.2003.09.063

Hong S, Mills PJ (2008) Effects of an exercise challenge on mobilization and surface marker expression of monocyte subsets in individuals with normal vs. elevated blood pressure. Brain Behav Immun 22:590–599. doi: 10.1016/j.bbi.2007.12.003

Hopps E, Caimi G (2015) Matrix metalloproteases as a pharmacological target in cardiovascular diseases. Eur Rev Med Pharmacol Sci 19:2583–2589

Horta BL, Schaan BD, Bielemann RM, et al (2015) Objectively measured physical activity and sedentary-time are associated with arterial stiffness in Brazilian young adults. Atherosclerosis 243:148–154. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.005

Howard BJ, Balkau B, Thorp AA, et al (2015) Associations of overall sitting time and TV viewing time with fibrinogen and C reactive protein: the AusDiab study. Br J Sports Med 49:255–258. doi: 10.1136/bjsports-2013-093014

Hu FB, Stampfer MJ, Colditz GA, et al (2000) Physical activity and risk of stroke in women. JAMA 283:2961–2967

Hu M, Lin W (2012) Effects of exercise training on red blood cell production: implications for anemia. Acta Haematol 127:156–164. doi: 10.1159/000335620

Huang C-J, McAllister MJ, Slusher AL, et al (2015) Obesity-Related Oxidative Stress: the Impact of Physical Activity and Diet Manipulation. Sports Med - Open 1:32. doi: 10.1186/s40798-015-0031-y

Huo Y, Schober A, Forlow SB, et al (2003) Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. Nat Med 9:61–67. doi: 10.1038/nm810

Hutter R, Speidl WS, Valdiviezo C, et al (2013) Macrophages Transmit Potent Proangiogenic Effects of oxLDL In Vitro and In Vivo Involving HIF-1α Activation: a Novel Aspect of Angiogenesis in Atherosclerosis. J Cardiovasc Transl Res 6:558–569. doi: 10.1007/s12265-013-9469-9

Hyafil F, Klein I, Desilles J-P, et al (2014) Rupture of nonstenotic carotid plaque as a cause of ischemic stroke evidenced by multimodality imaging. Circulation 129:130–131. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000467

- I -

Ibrahim H, Kleiman NS (2017) Platelet pathophysiology, pharmacology, and function in coronary artery disease. Coron Artery Dis. doi: 10.1097/MCA.0000000000000519

Idzkowska E, Eljaszewicz A, Miklasz P, et al (2015) The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. Scand J Immunol 82:163–173. doi: 10.1111/sji.12314

Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, et al (1999) Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. Circ Res 85:199–207

Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, et al (1996) Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. Circ Res 79:32–37

Inoue T, Node K (2006) Vascular failure: A new clinical entity for vascular disease. J Hypertens 24:2121–2130. doi: 10.1097/01.hjh.0000249684.76296.4f

Ionova VG (2003) State of the Rheological Properties of Blood in the Dynamics of Development of Acute Disturbances of Cerebral Circulation in Atherosclerosis Patients. J Eng Phys Thermophys 76:672–680. doi: 10.1023/A:1024749820805

- J -

Jae SY, Franklin BA, Schmidt-Trucksass A, et al (2016) Relation of Cardiorespiratory Fitness to Risk of Subclinical Atherosclerosis in Men With Cardiometabolic Syndrome. Am J Cardiol 118:1282–1286. doi: 10.1016/j.amjcard.2016.07.064

Jashari F, Ibrahimi P, Nicoll R, et al (2013) Coronary and carotid atherosclerosis: similarities and differences. Atherosclerosis 227:193–200. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.11.008

Johansson LH, Borg LA (1988) A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. Anal Biochem 174:331–336

Jonasson L, Holm J, Skalli O, et al (1986) Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. Arterioscler Dallas Tex 6:131–138

- K -

K E Powell, P D Thompson, C J Caspersen, Kendrick and JS (1987) Physical Activity and the Incidence of Coronary Heart Disease. Annu Rev Public Health 8:253–287. doi: 10.1146/annurev.pu.08.050187.001345

Kadoglou NPE, Kostomitsopoulos N, Kapelouzou A, et al (2011) Effects of exercise training on the severity and composition of atherosclerotic plaque in apoE-deficient mice. J Vasc Res 48:347–356. doi: 10.1159/000321174

Kalin MF, Zumoff B (1990) Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. Steroids 55:330–352

Kameneva MV, Undar A, Antaki JF, et al (1999) Decrease in red blood cell deformability caused by hypothermia, hemodilution, and mechanical stress: factors related to cardiopulmonary bypass. ASAIO J Am Soc Artif Intern Organs 1992 45:307–310

Kampmeier RH (1969) Atherosclerosis--its pathogenesis and clinical aspects. South Med J 62:1023–1024

Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, et al (2002) Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. Atherosclerosis 162:221–225

Kannel WB (1994) Risk factors for atherosclerotic cardiovascular outcomes in different arterial territories. J Cardiovasc Risk 1:333–339

Kargarfard M, Lam ETC, Shariat A, et al (2016) Effects of endurance and high intensity training on ICAM-1 and VCAM-1 levels and arterial pressure in obese and normal weight adolescents. Phys Sportsmed 44:208–216. doi: 10.1080/00913847.2016.1200442

Kashiwagi M, Imanishi T, Tsujioka H, et al (2010) Association of monocyte subsets with vulnerability characteristics of coronary plaques as assessed by 64-slice multidetector computed tomography in patients with stable angina pectoris. Atherosclerosis 212:171–176. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.05.004

Kawamura A, Miura S, Fujino M, et al (2003) CXCR3 chemokine receptor-plasma IP10 interaction in patients with coronary artery disease. Circ J Off J Jpn Circ Soc 67:851–854

Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K (2010) Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. Exerc Immunol Rev 16:105–118

Kensey KR (2003) The mechanistic relationships between hemorheological characteristics and cardiovascular disease. Curr Med Res Opin 19:587–596. doi: 10.1185/030079903125002289

Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, et al (2010) Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. PloS One 5:e8852. doi: 10.1371/journal.pone.0008852

Khan KM, Thompson AM, Blair SN, et al (2012) Sport and exercise as contributors to the health of nations. Lancet Lond Engl 380:59–64. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60865-4

Khanna AK, Xu J, Mehra MR (2011) Antioxidant N-acetyl cysteine reverses cigarette smoke-induced myocardial infarction by inhibiting inflammation and oxidative stress in a rat model. Lab Invest 92:224–235. doi: 10.1038/labinvest.2011.146

Khatri JJ, Johnson C, Magid R, et al (2004) Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. Circulation 109:520–525. doi: 10.1161/01.CIR.0000109698.70638.2B

Kilic-Erkek O, Kilic-Toprak E, Caliskan S, et al (2016) Detraining reverses exercise-induced improvement in blood pressure associated with decrements of oxidative stress in various tissues in spontaneously hypertensive rats. Mol Cell Biochem 412:209–219. doi: 10.1007/s11010-015-2627-4

Kim ES, Park J-H, Lee MK, et al (2011) Associations between Fatness, Fitness, IGF and IMT among Obese Korean Male Adolescents. Diabetes Metab J 35:610–618. doi: 10.4093/dmj.2011.35.6.610

Kim M, Yoo HJ, Kim M, et al (2017) Associations among oxidative stress, Lp-PLA2 activity and arterial stiffness according to blood pressure status at a 3.5-year follow-up in subjects with prehypertension. Atherosclerosis 257:179–185. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.01.006

Kim Y, Wilkens LR, Park S-Y, et al (2013) Association between various sedentary behaviours and all-cause, cardiovascular disease and cancer mortality: the Multiethnic Cohort Study. Int J Epidemiol 42:1040–1056. doi: 10.1093/ije/dyt108

Kimura S, Tanimoto A, Wang K-Y, et al (2012) Expression of macrophage-derived chemokine (CCL22) in atherosclerosis and regulation by histamine via the H2 receptor. Pathol Int 62:675–683. doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02854.x

Kizaki T, Takemasa T, Sakurai T, et al (2008) Adaptation of macrophages to exercise training improves innate immunity. Biochem Biophys Res Commun 372:152–156. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.05.005

Koenig W, Ernst E (1992) The possible role of hemorheology in atherothrombogenesis. Atherosclerosis 94:93–107

Koenig W, Sund M, Filipiak B, et al (1998) Plasma viscosity and the risk of coronary heart disease: results from the MONICA-Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18:768–772

Koga M, Kai H, Yasukawa H, et al (2007) Inhibition of progression and stabilization of plaques by postnatal interferon-gamma function blocking in ApoE-knockout mice. Circ Res 101:348–356. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.106.147256

Kozàkovà M, Palombo C, Morizzo C, et al (2010) Effect of sedentary behaviour and vigorous physical activity on segment-specific carotid wall thickness and its progression in a healthy population. Eur Heart J 31:1511–1519. doi: 10.1093/eurheartj/ehq092

Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, et al (2002) Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. N Engl J Med 347:1483–1492. doi: 10.1056/NEJMoa020194

Krause M, Rodrigues-Krause J, O'Hagan C, et al (2014) The effects of aerobic exercise training at two different intensities in obesity and type 2 diabetes: implications for oxidative stress, low-grade inflammation and nitric oxide production. Eur J Appl Physiol 114:251–260. doi: 10.1007/s00421-013-2769-6

Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, et al (2001) Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. Circulation 104:448–454

Kumar A, Kar S, Fay WP (2011) Thrombosis, physical activity, and acute coronary syndromes. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 111:599–605. doi: 10.1152/japplphysiol.00017.2011

Kushiyama A, Nakatsu Y, Matsunaga Y, et al (2016) Role of Uric Acid Metabolism-Related Inflammation in the Pathogenesis of Metabolic Syndrome Components Such as Atherosclerosis and Nonalcoholic Steatohepatitis. Mediators Inflamm 2016:8603164. doi: 10.1155/2016/8603164

Kwak BR, Bäck M, Bochaton-Piallat M-L, et al (2014) Biomechanical factors in atherosclerosis: mechanisms and clinical implications. Eur Heart J 35:3013–3020, 3020a-3020d. doi: 10.1093/eurheartj/ehu353

Kwaśniewska M, Jegier A, Kostka T, et al (2014) Long-Term Effect of Different Physical Activity Levels on Subclinical Atherosclerosis in Middle-Aged Men: A 25-Year Prospective Study. PLoS ONE 9:. doi: 10.1371/journal.pone.0085209

Kyu HH, Bachman VF, Alexander LT, et al (2016) Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. BMJ 354:i3857. doi: 10.1136/bmj.i3857

- ℒ -

La Favor JD, Dubis GS, Yan H, et al (2016) Microvascular Endothelial Dysfunction in Sedentary, Obese Humans Is Mediated by NADPH Oxidase: Influence of Exercise Training. Arterioscler Thromb Vasc Biol 36:2412–2420. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308339

Lakka TA, Laukkanen JA, Rauramaa R, et al (2001) Cardiorespiratory fitness and the progression of carotid atherosclerosis in middle-aged men. Ann Intern Med 134:12–20

LaMonte MJ, Durstine JL, Yanowitz FG, et al (2002) Cardiorespiratory fitness and C-reactive protein among a tri-ethnic sample of women. Circulation 106:403–406

Laufs U, Wassmann S, Czech T, et al (2005) Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:809–814. doi: 10.1161/01.ATV.0000158311.24443.af

Laughlin MH, Newcomer SC, Bender SB (2008) Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 104:588–600. doi: 10.1152/japplphysiol.01096.2007

Lee CD, Folsom AR, Blair SN (2003) Physical activity and stroke risk: a meta-analysis. Stroke 34:2475–2481. doi: 10.1161/01.STR.0000091843.02517.9D

Lee S, Park Y, Dellsperger KC, Zhang C (2011) Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 301:H306-314. doi: 10.1152/ajpheart.01306.2010

Lee SS, Kim NJ, Sun K, et al (2006) Association between arterial stiffness and the deformability of red blood cells (RBCs). Clin Hemorheol Microcirc 34:475–481

Leeuwenburgh C, Heinecke JW (2001) Oxidative stress and antioxidants in exercise. Curr Med Chem 8:829–838

Leischik R, Foshag P, Strauß M, et al (2015) Physical activity, cardiorespiratory fitness and carotid intima thickness: sedentary occupation as risk factor for atherosclerosis and obesity. Eur Rev Med Pharmacol Sci 19:3157–3168

Lesniewski LA, Durrant JR, Connell ML, et al (2011) Aerobic exercise reverses arterial inflammation with aging in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 301:H1025-1032. doi: 10.1152/ajpheart.01276.2010

Letcher RL, Chien S, Pickering TG, et al (1981) Direct relationship between blood pressure and blood viscosity in normal and hypertensive subjects. Role of fibrinogen and concentration. Am J Med 70:1195–1202

Levy BI, Schiffrin EL, Mourad J-J, et al (2008) Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. Circulation 118:968–976. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.763730

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, et al (2002) Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. Lancet Lond Engl 360:1903–1913

Li C, Jackson RM (2002) Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. Am J Physiol Cell Physiol 282:C227-241. doi: 10.1152/ajpcell.00112.2001

Li H, Förstermann U (2013) Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. Curr Opin Pharmacol 13:161–167. doi: 10.1016/j.coph.2013.01.006

Li L, Fink GD, Watts SW, et al (2003) Endothelin-1 Increases Vascular Superoxide Via EndothelinA–NADPH Oxidase Pathway in Low-Renin Hypertension. Circulation 107:1053–1058. doi: 10.1161/01.CIR.0000051459.74466.46

Li R, Cao Z, Li Y, Wang R (2015) Increased whole blood viscosity is associated with silent cerebral infarction. Clin Hemorheol Microcirc 59:301–307. doi: 10.3233/CH-131760

Li X, Yang Q, Wang Z, Wei D (2014a) Shear stress in atherosclerotic plaque determination. DNA Cell Biol 33:830–838. doi: 10.1089/dna.2014.2480

Li Y, He P-P, Zhang D-W, et al (2014b) Lipoprotein lipase: from gene to atherosclerosis. Atherosclerosis 237:597–608. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.016

Li Y, Pagano PJ (2017) Microvascular NADPH oxidase in health and disease. Free Radic Biol Med 109:33–47. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.049

Li Z, Yang F, Dunn S, et al (2011) Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis. Thromb Res 127:184–188. doi: 10.1016/j.thromres.2010.10.010

Liapis CD, Bell PF, Mikhailidis DP, et al (2010) ESVS Guidelines: Section A--prevention in patients with carotid stenosis. Curr Vasc Pharmacol 8:673–681

Libby P (2001) Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. Circulation 104:365–372

Libby P (2012) Inflammation in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 32:2045–2051. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179705

Libby P, Hansson GK (1991) Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. Lab Investig J Tech Methods Pathol 64:5–15

Libby P, Hansson GK (2015) Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. Circ Res 116:307–311. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.301313

Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002a) Inflammation and Atherosclerosis. Circulation 105:1135–1143. doi: 10.1161/hc0902.104353

Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002b) Inflammation and atherosclerosis. Circulation 105:1135–1143

Liem MI, Schreuder FHBM, van Dijk AC, et al (2015) Use of Antiplatelet Agents Is Associated With Intraplaque Hemorrhage on Carotid Magnetic Resonance Imaging: The Plaque at Risk Study. Stroke 46:3411–3415. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.008906

Lira FS, Rosa Neto JC, Antunes BMM, Fernandes RA (2014) The relationship between inflammation, dyslipidemia and physical exercise: from the epidemiological to molecular approach. Curr Diabetes Rev 10:391–396

Liu M, Guo S, Stiles JK (2011) The emerging role of CXCL10 in cancer (Review). Oncol Lett 2:583–589. doi: 10.3892/ol.2011.300

Loffredo L, Martino F, Carnevale R, et al (2012) Obesity and hypercholesterolemia are associated with NOX2 generated oxidative stress and arterial dysfunction. J Pediatr 161:1004–1009. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.05.042

Loprinzi PD, Addoh O (2016) The Effects of Free-Living Physical Activity on Mortality After Coronary Artery Disease Diagnosis. Clin Cardiol 39:165–169. doi: 10.1002/clc.22508

Loree HM, Kamm RD, Stringfellow RG, Lee RT (1992) Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. Circ Res 71:850–858

Lovett JK, Gallagher PJ, Hands LJ, et al (2004) Histological Correlates of Carotid Plaque Surface Morphology on Lumen Contrast Imaging. Circulation 110:2190–2197. doi: 10.1161/01.CIR.0000144307.82502.32

Lowe G, Rumley A, Norrie J, et al (2000) Blood rheology, cardiovascular risk factors, and cardiovascular disease: the West of Scotland Coronary Prevention Study. Thromb Haemost 84:553–558

Lowe GD (1992) Blood viscosity, lipoproteins, and cardiovascular risk. Circulation 85:2329–2331

Lowe GD, Lee AJ, Rumley A, et al (1997) Blood viscosity and risk of cardiovascular events: the Edinburgh Artery Study. Br J Haematol 96:168–173

Lu H-H, Sheng Z-Q, Wang Y, Zhang L (2010) Levels of soluble adhesion molecules in patients with various clinical presentations of coronary atherosclerosis. Chin Med J (Engl) 123:3123–3126

Luedemann J, Schminke U, Berger K, et al (2002) Association between behavior-dependent cardiovascular risk factors and asymptomatic carotid atherosclerosis in a general population. Stroke J Cereb Circ 33:2929–2935

- M -

Mach F, Sauty A, Iarossi AS, et al (1999) Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. J Clin Invest 104:1041–1050. doi: 10.1172/JCI6993

Mallat Z, Besnard S, Duriez M, et al (1999) Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. Circ Res 85:e17-24

Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, et al (2001) Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. Circ Res 89:930–934

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol 25:677–686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015

Marcus BH, Albrecht AE, King TK, et al (1999) The efficacy of exercise as an aid for smoking cessation in women: a randomized controlled trial. Arch Intern Med 159:1229–1234

Markus HS, Droste DW, Kaps M, et al (2005) Dual antiplatelet therapy with clopidogrel and aspirin in symptomatic carotid stenosis evaluated using doppler embolic signal detection: the Clopidogrel and Aspirin for Reduction of Emboli in Symptomatic Carotid Stenosis (CARESS) trial. Circulation 111:2233–2240. doi: 10.1161/01.CIR.0000163561.90680.1C

Marnane M, Prendeville S, McDonnell C, et al (2014) Plaque inflammation and unstable morphology are associated with early stroke recurrence in symptomatic carotid stenosis. Stroke J Cereb Circ 45:801–806. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.003657

Martin WH, Ogawa T, Kohrt WM, et al (1991) Effects of aging, gender, and physical training on peripheral vascular function. Circulation 84:654–664. doi: 10.1161/01.CIR.84.2.654

Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GRY (2011) Necrotic cell death in atherosclerosis. Basic Res Cardiol 106:749–760. doi: 10.1007/s00395-011-0192-x

Massberg S, Brand K, Grüner S, et al (2002) A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. J Exp Med 196:887–896

Mattusch F, Dufaux B, Heine O, et al (2000) Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training. Int J Sports Med 21:21–24. doi: 10.1055/s-2000-8852

McCarthy SM, Bove PF, Matthews DE, et al (2008) Nitric Oxide Regulation of MMP-9 Activation and Its Relationship to Modifications of the Cysteine Switch†. Biochemistry (Mosc) 47:5832–5840. doi: 10.1021/bi702496v

McKelvey TG, Höllwarth ME, Granger DN, et al (1988) Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. Am J Physiol 254:G753-760

McQuaid KE, Keenan AK (1997) Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: roles for nitric oxide? Exp Physiol 82:369–376

Meilhac O, Zhou M, Santanam N, Parthasarathy S (2000) Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. J Lipid Res 41:1205–1213

Mercier J, Perez-Martin A, Bigard X, Ventura R (1999) Muscle plasticity and metabolism: effects of exercise and chronic diseases. Mol Aspects Med 20:319–373

Merrouche M, Coffin B (2005) Obésité : prise en charge, indications et méthodes du traitement endoscopique et chirurgical. EMC - Hépato-Gastroenterol 2:189–200. doi: 10.1016/j.emchg.2005.01.008

Messier SP, Loeser RF, Mitchell MN, et al (2000) Exercise and weight loss in obese older adults with knee osteoarthritis: a preliminary study. J Am Geriatr Soc 48:1062–1072

Michel J-B, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G (2011a) Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. Eur Heart J 32:1977–1985, 1985a, 1985b, 1985c. doi: 10.1093/eurheartj/ehr054

Michel J-B, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G (2011b) Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. Eur Heart J 32:1977–1985, 1985a, 1985b, 1985c. doi: 10.1093/eurheartj/ehr054

Mihm MJ, Jing L, Bauer JA (2000) Nitrotyrosine causes selective vascular endothelial dysfunction and DNA damage. J Cardiovasc Pharmacol 36:182–187

Millon A, Canet-Soulas E, Boussel L, et al (2014) Animal models of atherosclerosis and magnetic resonance imaging for monitoring plaque progression. Vascular 22:221–237. doi: 10.1177/1708538113478758

Mills PJ, Hong S, Redwine L, et al (2006) Physical fitness attenuates leukocyte-endothelial adhesion in response to acute exercise. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 101:785–788. doi: 10.1152/japplphysiol.00135.2006

Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, et al (2001) Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. Eur J Appl Physiol 84:1–6. doi: 10.1007/s004210000342

Mohandas N, Evans E (1994) Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. Annu Rev Biophys Biomol Struct 23:787–818. doi: 10.1146/annurev.bb.23.060194.004035

Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM (2014) Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. Front Physiol 5:84. doi: 10.3389/fphys.2014.00084

Mono M-L, Karameshev A, Slotboom J, et al (2012) Plaque characteristics of asymptomatic carotid stenosis and risk of stroke. Cerebrovasc Dis Basel Switz 34:343–350. doi: 10.1159/000343227

Montezano AC, Touyz RM (2012) Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. Basic Clin Pharmacol Toxicol 110:87–94. doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00785.x

Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA (2013) Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. Nat Rev Immunol 13:709–721. doi: 10.1038/nri3520

Moore KJ, Tabas I (2011) Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. Cell 145:341–355. doi: 10.1016/j.cell.2011.04.005

Mora S, Cook N, Buring JE, et al (2007) Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms. Circulation 116:2110–2118. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.729939

Mora S, Lee I-M, Buring JE, Ridker PM (2006) Association of physical activity and body mass index with novel and traditional cardiovascular biomarkers in women. JAMA 295:1412–1419. doi: 10.1001/jama.295.12.1412

Moustardas P, Kadoglou NPE, Katsimpoulas M, et al (2014) The complementary effects of atorvastatin and exercise treatment on the composition and stability of the atherosclerotic plaques in ApoE knockout mice. PloS One 9:e108240. doi: 10.1371/journal.pone.0108240

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al (2015) Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. Circulation 131:e29-322. doi: 10.1161/CIR.0000000000000152

Mügge A, Elwell JH, Peterson TE, et al (1991) Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. Circ Res 69:1293–1300

Mughal MM, Khan MK, DeMarco JK, et al (2011) Symptomatic and asymptomatic carotid artery plaque. Expert Rev Cardiovasc Ther 9:1315–1330. doi: 10.1586/erc.11.120

Munsch B, Lizard G, Gueldry S, Gambert P (1995) [Agents inducing cell death of the vascular wall]. Ann Biol Clin (Paris) 53:473–480

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al (2014) Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity 41:14–20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008

- $\mathcal{N}$ -

Nader E, Connes P, Lamarre Y, et al (2017) Plasmapheresis may improve clinical condition in sickle cell disease through its effects on red blood cell rheology. Am J Hematol 92:E629–E630. doi: 10.1002/ajh.24870

Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, et al (1998) Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18:842–851

Nang EEK, van Dam RM, Tan CS, et al (2015) Association of Television Viewing Time with Body Composition and Calcified Subclinical Atherosclerosis in Singapore Chinese. PloS One 10:e0132161. doi: 10.1371/journal.pone.0132161

Nascimento D da C, Durigan R de CM, Tibana RA, et al (2015) The response of matrix metalloproteinase-9 and -2 to exercise. Sports Med Auckl NZ 45:269–278. doi: 10.1007/s40279-014-0265-8

Nash GB, Watts T, Thornton C, Barigou M (2008) Red cell aggregation as a factor influencing margination and adhesion of leukocytes and platelets. Clin Hemorheol Microcirc 39:303–310

Naylor AR, Rothwell PM, Bell PRF (2003) Overview of the principal results and secondary analyses from the European and North American randomised trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg 26:115–129

Nicoll R, Henein MY (2013) Arterial calcification: friend or foe? Int J Cardiol 167:322–327. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.06.110

Nikkilä EA, Kuusi T, Myllynen P (1980) High density lipoprotein and apolipoprotein A-I during physical inactivity: Demonstration of low levels in patients with spine fracture. Atherosclerosis 37:457–462. doi: 10.1016/0021-9150(80)90151-3

Nishiguchi T, Tanaka A, Taruya A, et al (2016) Local Matrix Metalloproteinase 9 Level Determines Early Clinical Presentation of ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. Arterioscler Thromb Vasc Biol 36:2460–2467. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308099

Nishitani-Yokoyama M, Miyauchi K, Shimada K, et al (2015) Effects of Phase II Comprehensive Cardiac Rehabilitation on Coronary Plaque Volume After Acute Coronary Syndrome. Int Heart J 56:597–604. doi: 10.1536/ihj.15-049

Nizet V, Johnson RS (2009) Interdependence of hypoxic and innate immune responses. Nat Rev Immunol 9:609–617. doi: 10.1038/nri2607

Nordestgaard BG, Nielsen LB (1994) Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. Curr Opin Lipidol 5:252–257

Nosova EV, Yen P, Chong KC, et al (2014) Short-term physical inactivity impairs vascular function. J Surg Res 190:672–682. doi: 10.1016/j.jss.2014.02.001

- O -

Oberley LW, Spitz DR (1984) Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. Methods Enzymol 105:457–464

Okafor ON, Farrington K, Gorog DA (2017) Allopurinol as a therapeutic option in cardiovascular disease. Pharmacol Ther 172:139–150. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.12.004

Olivieri O, Stranieri C, Bassi A, et al (2002) ApoC-III gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. J Lipid Res 43:1450–1457. doi: 10.1194/jlr.M200145-JLR200

Ookawara T, Haga S, Ha S, et al (2003) Effects of endurance training on three superoxide dismutase isoenzymes in human plasma. Free Radic Res 37:713–719

Owen N, Healy GN, Matthews CE, Dunstan DW (2010a) Too much sitting: the population health science of sedentary behavior. Exerc Sport Sci Rev 38:105–113. doi: 10.1097/JES.0b013e3181e373a2

Owen N, Sparling PB, Healy GN, et al (2010b) Sedentary behavior: emerging evidence for a new health risk. Mayo Clin Proc 85:1138–1141. doi: 10.4065/mcp.2010.0444

- 𝒫 -

P Duclos, P Duché, C-Y Guezennec, et al (2010) Position statement: Physical activity and obesity in adults and in children. http://sci-hub.tw/10.1016/j.scispo.2010.04.001. Accessed 10 Jan 2018

Pabisiak A, Bromboszcz J, Kmiec S, et al (2015) Changes in the complete blood count and blood rheology in patients after myocardial infarction participating in the rehabilitation programme. Clin Hemorheol Microcirc 61:541–547. doi: 10.3233/CH-151954

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. Physiol Rev 87:315–424. doi: 10.1152/physrev.00029.2006

Pahkala K, Laitinen TT, Heinonen OJ, et al (2013) Association of fitness with vascular intima-media thickness and elasticity in adolescence. Pediatrics 132:e77-84. doi: 10.1542/peds.2013-0041

Palmefors H, DuttaRoy S, Rundqvist B, Börjesson M (2014) The effect of physical activity or exercise on key biomarkers in atherosclerosis--a systematic review. Atherosclerosis 235:150–161. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.026

Pälve KS, Pahkala K, Magnussen CG, et al (2014) Association of physical activity in childhood and early adulthood with carotid artery elasticity 21 years later: the cardiovascular risk in Young Finns Study. J Am Heart Assoc 3:e000594. doi: 10.1161/JAHA.113.000594

Papageorgiou N, Tousoulis D, Miliou A, et al (2013) Combined effects of fibrinogen genetic variability on atherosclerosis in patients with or without stable angina pectoris: focus on the coagulation cascade and endothelial function. Int J Cardiol 168:4602–4607. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.07.162

Paraskevas KI, Mikhailidis DP, Veith FJ, Spence JD (2016) Definition of Best Medical Treatment in Asymptomatic and Symptomatic Carotid Artery Stenosis. Angiology 67:411–419. doi: 10.1177/0003319715624526

Parma L, Baganha F, Quax PHA, de Vries MR (2017) Plaque angiogenesis and intraplaque hemorrhage in atherosclerosis. Eur J Pharmacol. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.04.028

Parsons TJ, Sartini C, Welsh P, et al (2017) Physical Activity, Sedentary Behavior, and Inflammatory and Hemostatic Markers in Men. Med Sci Sports Exerc 49:459–465. doi: 10.1249/MSS.0000000000001113

Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW (1989) Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. Blood 74:2527–2534

Patel VK, Williams H, Li SCH, et al (2017) Monocyte inflammatory profile is specific for individuals and associated with altered blood lipid levels. Atherosclerosis 263:15–23. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.026

Pedersen BK (2017) Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. Eur J Clin Invest. doi: 10.1111/eci.12781

Pedrigi RM, de Silva R, Bovens SM, et al (2014) Thin-cap fibroatheroma rupture is associated with a fine interplay of shear and wall stress. Arterioscler Thromb Vasc Biol 34:2224–2231. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303426

Pelisek J, Eckstein H-H, Zernecke A (2012) Pathophysiological mechanisms of carotid plaque vulnerability: impact on ischemic stroke. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 60:431–442. doi: 10.1007/s00005-012-0192-z

Pfafferott C, Moessmer G, Ehrly AM, Bauersachs RM (1999) Involvement of erythrocyte aggregation and erythrocyte resistance to flow in acute coronary syndromes. Clin Hemorheol Microcirc 21:35

Pialoux V, Brown AD, Leigh R, et al (2009a) Effect of cardiorespiratory fitness on vascular regulation and oxidative stress in postmenopausal women. Hypertension 54:1014–1020. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138917

Pialoux V, Hanly PJ, Foster GE, et al (2009b) Effects of exposure to intermittent hypoxia on oxidative stress and acute hypoxic ventilatory response in humans. Am J Respir Crit Care Med 180:1002–1009. doi: 10.1164/rccm.200905-0671OC

Pialoux V, Mounier R, Brown AD, et al (2009c) Relationship between oxidative stress and HIF-1 alpha mRNA during sustained hypoxia in humans. Free Radic Biol Med 46:321–326. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.047

Pialoux V, Mounier R, Ponsot E, et al (2006) Effects of exercise and training in hypoxia on antioxidant/pro-oxidant balance. Eur J Clin Nutr 60:1345–1354. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602462

Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al (2016) 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). Eur Heart J 37:2315–2381. doi: 10.1093/eurheartj/ehw106

Pigłowska M, Kostka T, Drygas W, et al (2016) Body composition, nutritional status, and endothelial function in physically active men without metabolic syndrome--a 25 year cohort study. Lipids Health Dis 15:84. doi: 10.1186/s12944-016-0249-9

Pinto A, Di Raimondo D, Tuttolomondo A, et al (2012) Effects of physical exercise on inflammatory markers of atherosclerosis. Curr Pharm Des 18:4326–4349

Pischon T, Hankinson SE, Hotamisligil GS, et al (2003) Leisure-time physical activity and reduced plasma levels of obesity-related inflammatory markers. Obes Res 11:1055–1064. doi: 10.1038/oby.2003.145

Poggio R Preventable Ischaemic Heart Disease and Stroke Deaths Attributable to Insufficient Physical Activity: A Comparative Risk Assessment Analysis in the Argentinian Population, Preventable Ischaemic Heart Disease and Stroke Deaths Attributable to Insufficient Physical Activity: A Comparative Risk Assessment Analysis in the Argentinian Population

Porcheray F, Viaud S, Rimaniol A-C, et al (2005) Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. Clin Exp Immunol 142:481–489. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x

Power C, Pinto Pereira SM, Law C, Ki M (2014) Obesity and risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes: investigating the role of physical activity and sedentary behaviour in mid-life in the 1958 British cohort. Atherosclerosis 233:363–369. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.01.032

Prince SA, Blanchard CM, Grace SL, Reid RD (2016) Objectively-measured sedentary time and its association with markers of cardiometabolic health and fitness among cardiac rehabilitation graduates. Eur J Prev Cardiol 23:818–825. doi: 10.1177/2047487315617101

Purushothaman K-R, Purushothaman M, Muntner P, et al (2011) Inflammation, neovascularization and intra-plaque hemorrhage are associated with increased reparative collagen content: implication for plaque progression in diabetic atherosclerosis. Vasc Med Lond Engl 16:103–108. doi: 10.1177/1358863X11402249

- ℛ -

Radak Z, Chung HY, Goto S (2008) Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. Free Radic Biol Med 44:153–159. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.029

Rauramaa R, Halonen P, Väisänen SB, et al (2004) Effects of aerobic physical exercise on inflammation and atherosclerosis in men: the DNASCO Study: a six-year randomized, controlled trial. Ann Intern Med 140:1007–1014

Rauramaa R, Rankinen T, Tuomainen P, et al (1995) Inverse relationship between cardiorespiratory fitness and carotid atherosclerosis. Atherosclerosis 112:213–221

Rauramaa R, Salonen JT, Seppänen K, et al (1986) Inhibition of platelet aggregability by moderate-intensity physical exercise: a randomized clinical trial in overweight men. Circulation 74:939–944. doi: 10.1161/01.CIR.74.5.939

Rayssiguier Y, Gueux E, Bussiere L, Mazur A (1993) Copper deficiency increases the susceptibility of lipoproteins and tissues to peroxidation in rats. J Nutr 123:1343–1348

Redgrave JN, Gallagher P, Lovett JK, Rothwell PM (2008) Critical cap thickness and rupture in symptomatic carotid plaques: the oxford plaque study. Stroke J Cereb Circ 39:1722–1729. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.507988

Redgrave JNE, Lovett JK, Gallagher PJ, Rothwell PM (2006) Histological assessment of 526 symptomatic carotid plaques in relation to the nature and timing of ischemic symptoms: the Oxford plaque study. Circulation 113:2320–2328. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.589044

Richter JR, Sutton JM, Belizaire RM, et al (2014) Macrophage-Derived Chemokine (MDC/CCL22) is a Novel Mediator of Lung Inflammation Following Hemorrhage and Resuscitation. Shock Augusta Ga 42:525–531. doi: 10.1097/SHK.0000000000000253

Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al (2017) Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. N Engl J Med 377:1119–1131. doi: 10.1056/NEJMoa1707914

Ried-Larsen M, Grøntved A, Froberg K, et al (2013) Physical activity intensity and subclinical atherosclerosis in Danish adolescents: The European Youth Heart Study. Scand J Med Sci Sports 23:e168–e177. doi: 10.1111/sms.12046

Rimm EB, Williams P, Fosher K, et al (1999) Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. BMJ 319:1523–1528

Rius J, Guma M, Schachtrup C, et al (2008) NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. Nature 453:807–811. doi: 10.1038/nature06905

Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, et al (2012) CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. J Am Coll Cardiol 60:1512–1520. doi: 10.1016/j.jacc.2012.07.019

Rosenberg DE, Norman GJ, Wagner N, et al (2010) Reliability and validity of the Sedentary Behavior Questionnaire (SBQ) for adults. J Phys Act Health 7:697–705

Ross R (1999) Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. N Engl J Med 340:115–126. doi: 10.1056/NEJM199901143400207

Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, et al (1996) Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 16:1437–1447

Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, et al (2003) Analysis of pooled data from the randomised controlled trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. Lancet Lond Engl 361:107–116

Rothwell PM, Villagra R, Gibson R, et al (2000) Evidence of a chronic systemic cause of instability of atherosclerotic plaques. Lancet Lond Engl 355:19–24

Rowiński R, Kozakiewicz M, Kędziora-Kornatowska K, et al (2013) Markers of oxidative stress and erythrocyte antioxidant enzyme activity in older men and women with differing physical activity. Exp Gerontol 48:1141–1146. doi: 10.1016/j.exger.2013.07.010

Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM (1986) Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. Am J Physiol 250:H1145-1149

Rubio-Guerra AF, Vargas-Robles H, Serrano AM, et al (2010) Correlation between the levels of circulating adhesion molecules and atherosclerosis in hypertensive type-2 diabetic patients. Clin Exp Hypertens N Y N 1993 32:308–310. doi: 10.3109/10641960903443533

Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, et al (1998) Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. J Clin Invest 101:731–736. doi: 10.1172/JCI1699

Rush JWE, Denniss SG, Graham DA (2005) Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. Can J Appl Physiol Rev Can Physiol Appliquée 30:442–474

- S -

S P Sutera, Skalak and R (1993) The History of Poiseuille's Law. Annu Rev Fluid Mech 25:1–20. doi: 10.1146/annurev.fl.25.010193.000245

Saba L, Potters F, van der Lugt A, Mallarini G (2010) Imaging of the fibrous cap in atherosclerotic carotid plaque. Cardiovasc Intervent Radiol 33:681–689. doi: 10.1007/s00270-010-9828-8

Sadowski M, Ząbczyk M, Undas A (2014) Coronary thrombus composition: links with inflammation, platelet and endothelial markers. Atherosclerosis 237:555–561. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.020

Saito K, Nagatsuka K, Ishibashi-Ueda H, et al (2014) Contrast-enhanced ultrasound for the evaluation of neovascularization in atherosclerotic carotid artery plaques. Stroke J Cereb Circ 45:3073–3075. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006483

Saltin B (1985) Hemodynamic adaptations to exercise. Am J Cardiol 55:42D-47D

Sandor B, Nagy A, Toth A, et al (2014) Effects of moderate aerobic exercise training on hemorheological and laboratory parameters in ischemic heart disease patients. PloS One 9:e110751. doi: 10.1371/journal.pone.0110751

Sandrock M, Schulze C, Schmitz D, et al (2008) Physical activity throughout life reduces the atherosclerotic wall process in the carotid artery. Br J Sports Med 42:839–844. doi: 10.1136/bjsm.2007.040014

Santanam N, Aug N, Zhou M, et al (1999) Overexpression of human catalase gene decreases oxidized lipid-induced cytotoxicity in vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19:1912–1917

Scheer WD, Boudreau DA, Hixson JE, et al (2005) ACE insert/delete polymorphism and atherosclerosis. Atherosclerosis 178:241–247. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.09.019

Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, et al (2004) CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. Thromb Haemost 92:419–424. doi: 10.1160/TH04-02-0095

Schmid D, Ricci C, Leitzmann MF (2015) Associations of objectively assessed physical activity and sedentary time with all-cause mortality in US adults: the NHANES study. PloS One 10:e0119591. doi: 10.1371/journal.pone.0119591

Schmidt-Trucksäss A (2016) Does sedentary lifestyle touch arterial health? Atherosclerosis 244:222–223. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.107

Schmidt-Trucksäss AS, Grathwohl D, Frey I, et al (1999) Relation of leisure-time physical activity to structural and functional arterial properties of the common carotid artery in male subjects. Atherosclerosis 145:107–114

Schnohr P, O'Keefe JH, Lange P, et al (2017) Impact of persistence and non-persistence in leisure time physical activity on coronary heart disease and all-cause mortality: The Copenhagen City Heart Study. Eur J Prev Cardiol 2047487317721021. doi: 10.1177/2047487317721021

Selmeci L, Székely M, Soós P, et al (2006) Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels. Free Radic Res 40:952–958. doi: 10.1080/10715760600818789

Semple R (1953) Diabetes and peripheral arterial disease; a clinical study. Lancet Lond Engl 1:1064–1068

Sen CK, Packer L (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol 10:709–720

Shah PK (2007) Molecular mechanisms of plaque instability. Curr Opin Lipidol 18:492–499. doi: 10.1097/MOL.0b013e3282efa326

Shah PK (2003) Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. J Am Coll Cardiol 41:15S-22S

Shon S-M, Park J-H, Nahrendorf M, et al (2011) Exercise attenuates matrix metalloproteinase activity in preexisting atherosclerotic plaque. Atherosclerosis 216:67–73. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.036

Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol 82:291–295

Sigala F, Kotsinas A, Savari P, et al (2010) Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability. J Vasc Surg 52:704–713. doi: 10.1016/j.jvs.2010.03.047

Silva LR, Cavaglieri C, Lopes WA, et al (2014) Endothelial wall thickness, cardiorespiratory fitness and inflammatory markers in obese and non-obese adolescents. Braz J Phys Ther 18:47–55

Silveira LS, Antunes B de MM, Minari ALA, et al (2016) Macrophage Polarization: Implications on Metabolic Diseases and the Role of Exercise. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 26:115–132. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2016015920

Silvestre-Roig C, Winther MP de, Weber C, et al (2014) Atherosclerotic Plaque Destabilization Mechanisms, Models, and Therapeutic Strategies. Circ Res 114:214–226. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302355

Simmonds MJ, Minahan CL, Serre KR, et al (2012) Preliminary findings in the heart rate variability and haemorheology response to varied frequency and duration of walking in women 65-74 yr with type 2 diabetes. Clin Hemorheol Microcirc 51:87–99. doi: 10.3233/CH-2011-1514

Skrypnik D, Bogdański P, Madry E, et al (2014) [Effect of physical exercise on endothelial function, indicators of inflammation and oxidative stress]. Pol Merkur Lek Organ Pol Tow Lek 36:117–121

Slentz CA, Houmard JA, Johnson JL, et al (2007) Inactivity, exercise training and detraining, and plasma lipoproteins. STRRIDE: a randomized, controlled study of exercise intensity and amount. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 103:432–442. doi: 10.1152/japplphysiol.01314.2006

Sloop GD, Garber DW (1997) The effects of low-density lipoprotein and high-density lipoprotein on blood viscosity correlate with their association with risk of atherosclerosis in humans. Clin Sci Lond Engl 1979 92:473–479

Sluimer JC, Gasc J-M, van Wanroij JL, et al (2008) Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. J Am Coll Cardiol 51:1258–1265. doi: 10.1016/j.jacc.2007.12.025

Sluimer JC, Kolodgie FD, Bijnens APJJ, et al (2009) Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. J Am Coll Cardiol 53:1517–1527. doi: 10.1016/j.jacc.2008.12.056

Smith JA, Martin DT, Telford RD, Ballas SK (1999a) Greater erythrocyte deformability in world-class endurance athletes. Am J Physiol 276:H2188-2193

Smith JK, Dykes R, Douglas JE, et al (1999b) Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. JAMA J Am Med Assoc 281:1722–1727

Smith WC, Lowe GD, Lee AJ, Tunstall-Pedoe H (1992) Rheological determinants of blood pressure in a Scottish adult population. J Hypertens 10:467–472

Sofi F, Capalbo A, Cesari F, et al (2008) Physical activity during leisure time and primary prevention of coronary heart disease: an updated meta-analysis of cohort studies. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 15:247–257. doi: 10.1097/HJR.0b013e3282f232ac

Sokol SI, Kapoor JR, Foody JM (2006) Blood pressure reduction in the primary and secondary prevention of stroke. Curr Vasc Pharmacol 4:155–160

Somer T, Meiselman HJ (1993) Disorders of blood viscosity. Ann Med 25:31–39

Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, et al (2002) Superoxide Production and Expression of Nox Family Proteins in Human Atherosclerosis. Circulation 105:1429–1435. doi: 10.1161/01.CIR.0000012917.74432.66

Soumyarani VS, Jayakumari N (2012) Oxidatively modified high density lipoprotein promotes inflammatory response in human monocytes-macrophages by enhanced production of ROS, TNF-α, MMP-9, and MMP-2. Mol Cell Biochem 366:277–285. doi: 10.1007/s11010-012-1306-y

Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, et al (2003) Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. Circulation 107:1383–1389

Srivastava RAK, Mistry S, Sharma S (2015) A novel anti-inflammatory natural product from Sphaeranthus indicus inhibits expression of VCAM1 and ICAM1, and slows atherosclerosis progression independent of lipid changes. Nutr Metab 12:20. doi: 10.1186/s12986-015-0018-1

Stadtman ER (1992) Protein oxidation and aging. Science 257:1220–1224

Stamatakis E, Hamer M, Lawlor DA (2009) Physical activity, mortality, and cardiovascular disease: is domestic physical activity beneficial? The Scottish Health Survey -- 1995, 1998, and 2003. Am J Epidemiol 169:1191–1200. doi: 10.1093/aje/kwp042

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15:1512–1531

Stein RA, Rockman CB, Guo Y, et al (2015) Association Between Physical Activity and Peripheral Artery Disease and Carotid Artery Stenosis in a Self-Referred Population of 3 Million Adults. Arterioscler Thromb Vasc Biol 35:206–212. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304161

Stepp DW, Ou J, Ackerman AW, et al (2002) Native LDL and minimally oxidized LDL differentially regulate superoxide anion in vascular endothelium in situ. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283:H750-759. doi: 10.1152/ajpheart.00029.2002

Steppich B, Dayyani F, Gruber R, et al (2000) Selective mobilization of CD14(+)CD16(+) monocytes by exercise. Am J Physiol Cell Physiol 279:C578-586. doi: 10.1152/ajpcell.2000.279.3.C578

Steven S, Daiber A, Dopheide JF, et al (2017) Peripheral artery disease, redox signaling, oxidative stress - Basic and clinical aspects. Redox Biol 12:787–797. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.017

Stout RD, Jiang C, Matta B, et al (2005) Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. J Immunol Baltim Md 1950 175:342–349

Surya II, Gorter G, Mommersteeg M, Akkerman JW (1992) Enhancement of platelet functions by low density lipoproteins. Biochim Biophys Acta 1165:19–26

Swardfager W, Herrmann N, Cornish S, et al (2012) Exercise intervention and inflammatory markers in coronary artery disease: a meta-analysis. Am Heart J 163:666-676.e1–3. doi: 10.1016/j.ahj.2011.12.017

Szapary L, Horvath B, Marton Z, et al (2004) Short-term effect of low-dose atorvastatin on haemorrheological parameters, platelet aggregation and endothelial function in patients with cerebrovascular disease and hyperlipidaemia. CNS Drugs 18:165–172

Szocs K (2004) Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. Gen Physiol Biophys 23:265–295

Szostak J, Laurant P (2011) The forgotten face of regular physical exercise: a “natural” anti-atherogenic activity. Clin Sci Lond Engl 1979 121:91–106. doi: 10.1042/CS20100520

- $\mathcal{T}$ -

Tabas I, Bornfeldt KE (2016) Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. Circ Res 118:653–667. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306256

Takaya N, Yuan C, Chu B, et al (2006) Association between carotid plaque characteristics and subsequent ischemic cerebrovascular events: a prospective assessment with MRI--initial results. Stroke J Cereb Circ 37:818–823. doi: 10.1161/01.STR.0000204638.91099.91

Takaya N, Yuan C, Chu B, et al (2005) Presence of intraplaque hemorrhage stimulates progression of carotid atherosclerotic plaques: a high-resolution magnetic resonance imaging study. Circulation 111:2768–2775. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.504167

Takeshita S, Inoue N, Ueyama T, et al (2000) Shear stress enhances glutathione peroxidase expression in endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 273:66–71. doi: 10.1006/bbrc.2000.2898

Takeya Y, Popper JS, Shimizu Y, et al (1984) Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: incidence of stroke in Japan and Hawaii. Stroke 15:15–23

Taleb S (2016) Inflammation in atherosclerosis. Arch Cardiovasc Dis 109:708–715. doi: 10.1016/j.acvd.2016.04.002

Tanaka A, Imanishi T, Kitabata H, et al (2008) Morphology of exertion-triggered plaque rupture in patients with acute coronary syndrome: an optical coherence tomography study. Circulation 118:2368–2373. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.782540

Tanaka H, DeSouza CA, Seals DR (1998) Absence of Age-Related Increase in Central Arterial Stiffness in Physically Active Women. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18:127–132. doi: 10.1161/01.ATV.18.1.127

Tanaka H, Dinenno FA, Monahan KD, et al (2000) Aging, Habitual Exercise, and Dynamic Arterial Compliance. Circulation 102:1270–1275. doi: 10.1161/01.CIR.102.11.1270

Tanaka H, Seals DR, Monahan KD, et al (2002) Regular aerobic exercise and the age-related increase in carotid artery intima-media thickness in healthy men. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 92:1458–1464. doi: 10.1152/japplphysiol.00824.2001

Taylor BA, Zaleski AL, Capizzi JA, et al (2014) Influence of chronic exercise on carotid atherosclerosis in marathon runners. BMJ Open 4:e004498. doi: 10.1136/bmjopen-2013-004498

Thivel D, Metz L, Aucouturier J, et al (2013) The effects of imposed sedentary behavior and exercise on energy intake in adolescents with obesity. J Dev Behav Pediatr JDBP 34:616–622. doi: 10.1097/DBP.0000000000000010

Thompson PD, Buchner D, Piña IL, et al (2003) Exercise and Physical Activity in the Prevention and Treatment of Atherosclerotic Cardiovascular Disease A Statement From the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). Circulation 107:3109–3116. doi: 10.1161/01.CIR.0000075572.40158.77

Thosar SS, Bielko SL, Wiggins CC, et al (2015) Antioxidant vitamin C prevents decline in endothelial function during sitting. Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res 21:1015–1021

Tian R, Ding Y, Peng Y-Y, Lu N (2017) Myeloperoxidase amplified high glucose-induced endothelial dysfunction in vasculature: Role of NADPH oxidase and hypochlorous acid. Biochem Biophys Res Commun 484:572–578. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.132

Tikhomirova I, Petrochenko E, Muravyov A, et al (2017) Microcirculation and blood rheology abnormalities in chronic heart failure. Clin Hemorheol Microcirc 65:383–391. doi: 10.3233/CH-16206

Tikhomirova IA, Oslyakova AO, Mikhailova SG (2011) Microcirculation and blood rheology in patients with cerebrovascular disorders. Clin Hemorheol Microcirc 49:295–305. doi: 10.3233/CH-2011-1480

Toledo-Arruda AC, Vieira RP, Guarnier FA, et al (2017) Time-course effects of aerobic physical training in the prevention of cigarette smoke-induced COPD. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 123:674–683. doi: 10.1152/japplphysiol.00819.2016

Torzewski M, Ochsenhirt V, Kleschyov AL, et al (2007) Deficiency of glutathione peroxidase-1 accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27:850–857. doi: 10.1161/01.ATV.0000258809.47285.07

Tosukhowong P, Sangwatanaroj S, Jatuporn S, et al (2003) The correlation between markers of oxidative stress and risk factors of coronary artery disease in Thai patients. Clin Hemorheol Microcirc 29:321–329

Totsimon K, Nagy A, Sandor B, et al (2016) Hemorheological alterations in carotid artery stenosis. Clin Hemorheol Microcirc 64:55–63. doi: 10.3233/CH-162043

Tronc F, Mallat Z, Lehoux S, et al (2000) Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:E120-126

Tsiantoulas D, Perkmann T, Afonyushkin T, et al (2015) Circulating microparticles carry oxidation-specific epitopes and are recognized by natural IgM antibodies. J Lipid Res 56:440–448. doi: 10.1194/jlr.P054569

Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mähönen M, et al (1999) Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. Lancet Lond Engl 353:1547–1557

Turc G, Oppenheim C, Naggara O, et al (2012) Relationships between recent intraplaque hemorrhage and stroke risk factors in patients with carotid stenosis: the HIRISC study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 32:492–499. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.239335

Tziomalos K, Athyros VG, Mikhailidis DP (2008) Statin discontinuation: an underestimated risk? Curr Med Res Opin 24:3059–3062. doi: 10.1185/03007990802469102

- $\mathcal{U}$ -

Ungurianu A, Margină D, Grădinaru D, et al (2017) Lipoprotein redox status evaluation as a marker of cardiovascular disease risk in patients with inflammatory disease. Mol Med Rep 15:256–262. doi: 10.3892/mmr.2016.5972

Ussher M, Nunziata P, Cropley M, West R (2001) Effect of a short bout of exercise on tobacco withdrawal symptoms and desire to smoke. Psychopharmacology (Berl) 158:66–72. doi: 10.1007/s002130100846

- $\mathcal{V}$ -

Valentine RJ, Vieira VJ, Woods JA, Evans EM (2009) Stronger relationship between central adiposity and C-reactive protein in older women than men. Menopause N Y N 16:84–89. doi: 10.1097/gme.0b013e31817fcb8f

Van Craenenbroeck AH, Van Ackeren K, Hoymans VY, et al (2014) Acute exercise-induced response of monocyte subtypes in chronic heart and renal failure. Mediators Inflamm 2014:216534. doi: 10.1155/2014/216534

van Dam RM, Li T, Spiegelman D, et al (2008) Combined impact of lifestyle factors on mortality: prospective cohort study in US women. BMJ 337:a1440

van den Borne P, Quax PHA, Hoefer IE, Pasterkamp G (2014) The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease. BioMed Res Int 2014:893106. doi: 10.1155/2014/893106

Varlet-Marie E, Guiraudou M, Fédou C, et al (2013) Nutritional and metabolic determinants of blood rheology differ between trained and sedentary individuals. Clin Hemorheol Microcirc 55:39–54. doi: 10.3233/CH-131688

Velasco M, Rojas E, Pirela VB (2013) Approach to a successful selection of antihypertensive drugs for the patient with atherosclerosis. Am J Ther 20:442–447. doi: 10.1097/MJT.0b013e318235f190

Velcheva I, Antonova N, Titianova E, et al (2006) Hemorheological parameters in correlation with the risk factors for carotid atherosclerosis. Clin Hemorheol Microcirc 35:195–198

Vendrov AE, Hakim ZS, Madamanchi NR, et al (2007) Atherosclerosis Is Attenuated by Limiting Superoxide Generation in Both Macrophages and Vessel Wall Cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27:2714–2721. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.152629

Victor VM, Rocha M, Solá E, et al (2009) Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. Curr Pharm Des 15:2988–3002

Villareal DT, Chode S, Parimi N, et al (2011) Weight Loss, Exercise, or Both and Physical Function in Obese Older Adults. N Engl J Med 364:1218–1229. doi: 10.1056/NEJMoa1008234

Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al (2005) Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:2054–2061. doi: 10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18

Vita JA, Brennan M-L, Gokce N, et al (2004) Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. Circulation 110:1134–1139. doi: 10.1161/01.CIR.0000140262.20831.8F

Vlaanderen J, van Veldhoven K, Font-Ribera L, et al (2017) Acute changes in serum immune markers due to swimming in a chlorinated pool. Environ Int 105:1–11. doi: 10.1016/j.envint.2017.04.009

Vogel DYS, Kooij G, Heijnen PDAM, et al (2015) GM-CSF promotes migration of human monocytes across the blood brain barrier. Eur J Immunol 45:1808–1819. doi: 10.1002/eji.201444960

Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C (2009a) The role of oxidative stress in atherosclerosis. Hell J Cardiol HJC Hell Kardiologike Epitheorese 50:402–409

Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C (2009b) The role of oxidative stress in atherosclerosis. Hell J Cardiol HJC Hellēnikē Kardiologikē Epitheōrēsē 50:402–409

Vries MHM, Wagenaar A, Verbruggen SEL, et al (2015) CXCL1 promotes arteriogenesis through enhanced monocyte recruitment into the peri-collateral space. Angiogenesis 18:163–171. doi: 10.1007/s10456-014-9454-1

- $\mathcal{W}$ -

Wahl P, Bloch W, Mester J, et al (2012) Effects of different levels of compression during sub-maximal and high-intensity exercise on erythrocyte deformability. Eur J Appl Physiol 112:2163–2169. doi: 10.1007/s00421-011-2186-7

Walker MA, Hoier B, Walker PJ, et al (2016) Vasoactive enzymes and blood flow responses to passive and active exercise in peripheral arterial disease. Atherosclerosis 246:98–105. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.12.029

Wang J, Jen CJ, Chen H (1995) Effects of Exercise Training and Deconditioning on Platelet Function in Men. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15:1668–1674. doi: 10.1161/01.ATV.15.10.1668

Wang J-S, Lee T, Chow S-E (2006) Role of exercise intensities in oxidized low-density lipoprotein-mediated redox status of monocyte in men. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 101:740–744. doi: 10.1152/japplphysiol.00144.2006

Wang X, Lin WH, Zhao YD, et al (2013) The effectiveness of dual antiplatelet treatment in acute ischemic stroke patients with intracranial arterial stenosis: a subgroup analysis of CLAIR study. Int J Stroke Off J Int Stroke Soc 8:663–668. doi: 10.1111/j.1747-4949.2012.00828.x

Wang X, Yang L, Liu Y, et al (2009) Oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) impacts on erythrocyte viscoelasticity and its molecular mechanism. J Biomech 42:2394–2399. doi: 10.1016/j.jbiomech.2009.05.026

Wang Y, Pan Y, Zhao X, et al (2015) Clopidogrel With Aspirin in Acute Minor Stroke or Transient Ischemic Attack (CHANCE) Trial: One-Year Outcomes. Circulation 132:40–46. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014791

Watts T, Barigou M, Nash GB (2013) Comparative rheology of the adhesion of platelets and leukocytes from flowing blood: why are platelets so small? Am J Physiol Heart Circ Physiol 304:H1483-1494. doi: 10.1152/ajpheart.00881.2012

Weber C, Erl W, Pietsch A, et al (1994) Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor- kappa B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. Arterioscler Thromb Vasc Biol 14:1665–1673. doi: 10.1161/01.ATV.14.10.1665

Wesnigk J, Bruyndonckx L, Hoymans VY, et al (2016) Impact of Lifestyle Intervention on HDL-Induced eNOS Activation and Cholesterol Efflux Capacity in Obese Adolescent. Cardiol Res Pract 2016:2820432. doi: 10.1155/2016/2820432

Whang W, Manson JE, Hu FB, et al (2006) Physical exertion, exercise, and sudden cardiac death in women. JAMA 295:1399–1403. doi: 10.1001/jama.295.12.1399

Williams KJ, Tabas I (1995) The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15:551–561

Willich SN, Lewis M, Löwel H, et al (1993) Physical exertion as a trigger of acute myocardial infarction. Triggers and Mechanisms of Myocardial Infarction Study Group. N Engl J Med 329:1684–1690. doi: 10.1056/NEJM199312023292302

Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, et al (1998) Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. Circulation 97:1837–1847

Wilund KR, Tomayko EJ, Evans EM, et al (2008) Physical activity, coronary artery calcium, and bone mineral density in elderly men and women: a preliminary investigation. Metabolism 57:584–591. doi: 10.1016/j.metabol.2007.11.024

Wirth K, Klenk J, Brefka S, et al (2017) Biomarkers associated with sedentary behaviour in older adults: A systematic review. Ageing Res Rev 35:87–111. doi: 10.1016/j.arr.2016.12.002

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, et al (1998) Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. J Immunol Baltim Md 1950 161:2524–2532

Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, et al (2011) Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. Blood 118:e16-31. doi: 10.1182/blood-2010-12-326355

Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, et al (2012) The three human monocyte subsets: implications for health and disease. Immunol Res 53:41–57. doi: 10.1007/s12026-012-8297-3

World Health Organization (2010) Global recommendations on physical activity for health.

- *x* -

Xue J, Schmidt SV, Sander J, et al (2014) Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. Immunity 40:274–288. doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.006

- *y* -

Yakeu G, Butcher L, Isa S, et al (2010) Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: Roles of PPAR[gamma] and Th2 cytokines. Atherosclerosis 212:668–673. doi: 16/j.atherosclerosis.2010.07.002

Yalcin, al. (2003) Time course of hemorheological alterations after heavy anaerobic exercise in untrained human subjects. - PubMed - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yalcin+O%2C+Erman+A%2C+Muratli+S%2C+et+al+.++Time+course+of+hemorheological+alterations+after+heavy+anaerobic+exercise+in+untrained+human+subjects. Accessed 26 Jan 2018

Yang A-L, Chen H-I (2003) Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. Atherosclerosis 169:11–17

Yegin A, Yegin H, Alicigüzel Y, et al (1997) Erythrocyte selenium-glutathione peroxidase activity is lower in patients with coronary atherosclerosis. Jpn Heart J 38:793–798

Yu BP (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev 74:139–162

Yu Z, Ye X, Wang J, et al (2009) Associations of physical activity with inflammatory factors, adipocytokines, and metabolic syndrome in middle-aged and older chinese people. Circulation 119:2969–2977. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.833574

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al (2004) Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. Lancet Lond Engl 364:937–952. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17018-9

- Z -

Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, et al (2011) SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. Blood 118:e50-61. doi: 10.1182/blood-2011-01-326827

Zeltser D, Bornstein NM, Rotstein R, et al (2001) The erythrocyte adhesiveness/aggregation test in the peripheral blood of patients with ischemic brain events. Acta Neurol Scand 103:316–319

Zhang K, Tian L, Liu L, et al (2013) CXCL1 contributes to β-amyloid-induced transendothelial migration of monocytes in Alzheimer's disease. PloS One 8:e72744. doi: 10.1371/journal.pone.0072744

Zhang N, Andresen BT, Zhang C (2010) Inflammation and reactive oxygen species in cardiovascular disease. World J Cardiol 2:408–410. doi: 10.4330/wjc.v2.i12.408

Zhao S, Zhang Z, Long Q, et al (2016) Association between Time of Day of Sports-Related Physical Activity and the Onset of Acute Myocardial Infarction in a Chinese Population. PLoS ONE 11:. doi: 10.1371/journal.pone.0146472

Zhou J, Li Y-S, Chien S (2014) Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. Arterioscler Thromb Vasc Biol 34:2191–2198. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303422

Zhu S, Meng Q-H (2006) Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with carotid atherosclerosis. Clin Chem Lab Med 44:282–284. doi: 10.1515/CCLM.2006.048

Ziegler-Heitbrock L (2007) The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. J Leukoc Biol 81:584–592. doi: 10.1189/jlb.0806510

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood 116:e74–e80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558

Zoppini G, Targher G, Zamboni C, et al (2006) Effects of moderate-intensity exercise training on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in older patients with type 2 diabetes. Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD 16:543–549. doi: 10.1016/j.numecd.2005.09.004

Zorba E, Cengiz T, Karacabey K (2011) Exercise training improves body composition, blood lipid profile and serum insulin levels in obese children. J Sports Med Phys Fitness 51:664–669

(1997) EUROASPIRE. A European Society of Cardiology survey of secondary prevention of coronary heart disease: principal results. EUROASPIRE Study Group. European Action on Secondary Prevention through Intervention to Reduce Events. Eur Heart J 18:1569–1582

PARTIE 6 – VALORISATIONS

A. PUBLICATIONS

1. Articles indexés dans PubMed

Renoux C, Joly P, Faes C, **Mury P**, Eglenen B, Turkay M, Yavas G, Yalcin O, Bertrand Y, Garnier N, Cuzzubbo D, Gauthier A, Romana M, Moeckesch B, Cannas G, Antoine-Jonville S, Pialoux V and Connes P. *Association between Oxidative Stress, Genetic Factors, and Clinical Severity in Children with Sickle Cell Anemia.* **The Journal of Pediatrics** 2018 Feb 13. pii: S0022-3476(17)31659-1 (IF_{2017} = 3,87)

Mury P, Faes C, Millon A, Mura M, Renoux C, Skinner S, Nicaise V, Joly P, Della Schiava N, Lermusiaux P, Connes P*, Pialoux V*. *Higher daily physical activity level is associated with lower RBC aggregation in carotid artery disease patients at high risk of stroke*.
Frontiers in Physiology 2017 Dec 12; 8:1043. (IF_{2017} = 4,13)

Giannarelli C, Rodriguez DT, Zafar MU, Christoffel D, Vialou V, Peña C, Badimon A, Hodes GF, **Mury P**, Rabkin J, Alique M, Villa G, Argmann C, Nestler EJ, Russo SJ, Badimon JJ. *Susceptibility to chronic social stress increases plaque progression, vulnerability and platelet activation.*
Thromb Haemost. 2017 Apr 3; 117(4): 816-818 (IF_{2017} = 4,07)

Debevec T, Pialoux V, Saugy J, Schmitt L, Cejuela R, **Mury P**, Ehrström S, Faiss R, Millet GP. *Prooxidant/Antioxidant balance following Normobaric or Hypobaric "LiveHigh-TrainLow*.
PLoS One. 2015 Sep 14; 10(9): e0137957 (IF_{2015} = 3,54)

Diaw M, Pialoux V, Martin C, Samb A, Diop S, Faes C, **Mury P**, Sall ND, Diop SN, Ranque B, Mbaye MN, Gueye MD, Key NS, Connes P. *Sickle cell trait worsens oxidative stress, abnormal blood rheology and vascular dysfunction in type 2 diabetes*.
Diabetes Care. 2015 Nov ;38(11): 2120-7 (IF_{2015} = 8,93)

Prieur F, Pialoux V, Mestas JL, **Mury P**, Skinner S, Lafon C. *Evaluation of inertial activity in tissue through measurement of oxidative stress.*
Ultrasonics Sonochemistry. 2015 Sep; 26: 193-9 (IF_{2015} = 4,56)

Debevec T, Pialoux V, Mekjavic IB, Eiken O, **Mury P**, Millet GP. *Moderate exercise blunts oxidative stress induced by normobaric hypoxic confinement.*
Med Sci Sports Exerc. 2014 Jan ;46(1) : 33-41. (IF_{2014} = 4,06)

2. Articles soumis

Mury P, Mura M, Della Schiava N, Chanon S, Vieille-Marchiset A, Nicaise V, Chirico EN, Collet-Benzaquen D, Lermusiaux P, Connes P, Millon A, Pialoux V. *Effects of physical activity and sedentary behavior on intraplaque hemorrhage of asymptomatic carotid atherosclerotic plaque.*
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. (IF_{2017} = 6,61)

Mury P, Chirico EN, Mura M, Millon A, Canet-Soulas E, Pialoux V. *Oxidative stress and inflammation, key targets of the vulnerable atherosclerotic plaque: potential impact of physical activity*.
Sports Medicine. (IF_{2017} = 6,83)

Rahman A, Chudnovskiy A, Amadori L, Koplev S, David Amir E, Kim-Schulze S, **Mury P**, Fernandez N, Remark R, Li J, Pina C, Moss N, Faries C, Awad A, Bjorkegren J, Mocco J, Gnjatic S, Faries P, Maya'an A, Merad M, Giannarelli C. *Multiscale Single Cell Analyses Reveal Distinct Systemic and Tissue-Specific Immune Dysregulations in Advanced Atherosclerotic Lesions*.
Nature Communications. (IF_{2017} = 12,12)

3. Articles en rédaction

Mury P, Weiss-Gayet M, Mura M, Nicaise V, Mounier R, Millon A, Chazaud B, Pialoux V. *Effects of physical activity and sedentary behavior on monocyte phenotype modulation in patients at high-risk of stroke*.

Mura M, Kondjoyan JL, **Mury P**, Pialoux V, Millon A. *Links between Intraplaque haemorrhage and stroke: the in vivo detection.* A soumettre European Journal of Vascular and Endovascular Surgery

B. COMMUNICATIONS

1. Communications affichées

Mury P, Mura M, Nicaise V, Millon A and Pialoux V. *Effects of physical activity and sedentary behavior on histological risk factors of carotid atherosclerotic plaque instability*.
Journée scientifique de la SFR Santé Lyon Est, Lyon, France, Déc 2017

Mury P, Faes C, Millon A, Renoux C, Mura M, Nicaise V, Connes P & Pialoux V. *Effet de l'activité physique sur l'agrégation érythrocytaire chez des patients à risque d'AVC*. 17ème congrès de l'ACAPS, Dijon, France, 29-31 Oct 2017

Mury P, Faes C, Millon A, Renoux C, Mura M, Nicaise V, Connes P & Pialoux V. *Effet de l'activité physique sur l'agrégation érythrocytaire chez des patients à risque d'AVC*. Congrès annuel du Club du Globule Rouge et du Fer, Île de Ré, France, 28-29 Sept 2017

Mury P, Mura M, Nicaise V, Pialoux V and Millon A. *Impact de l'activité physique et de la sédentarité sur les facteurs de risque biologiques de l'instabilité de la plaque d'athérosclérose*. 13ème Congrès de la NSFA, Biarritz, France, Juin 2017

Rahman A, Amadori L, Kim-Schulze S, **Mury P**, Moss N, Li J, Pina C, Faries P, Merad M, Giannarelli C. *Single-cell intracellular signaling identifies CCL5 as a potential key driver of myeloid cell reprograming in atherosclerotic patients.* ATVB/PVD Conference, Minneapolis, Minn, USA, Mai 4-6, 2017

Mury P, Mura M, Nicaise V, Millon A and Pialoux V. *Effects of physical activity and sedentary behavior on histological risk factors of carotid atherosclerotic plaque instability*. 85th EAS Congress, Prague, Czech Republic, Avril 2017

2. Communications orales

Mury P, Weiss-Gayet M, Mura M, Millon A, Chazaud B & Pialoux V. *Effets de l'activité physique et de la sédentarité sur la polarisation des monocytes circulants chez le patient à risque d'AVC*. 14ème Congrès de la NSFA, Biarritz, 20-22 Juin 2018

Mury P, Mura M, Nicaise V, Pialoux V & Millon A. *Effets de l'activité physique et de la sédentarité sur les facteurs de risque histologiques d'instabilité de la plaque d'athérosclérose.* 17ème Congrès de l'ACAPS, Dijon, France, 29-31 Oct 2017

Mury P, Mura M, Nicaise V, Pialoux V & Millon A. *Effects of physical activity and sedentary behavior on histological risk factors of carotid atherosclerotic plaque instability*. 31st ESVS Congress, Lyon, France, Sept 19-22

Diaw M, Pialoux V, Martin C, Samb A, Diop S, Faes C, **Mury P**, Sall ND, Diop SN, Ranque B, Mbaye MN, Gueye MD, Key NS, Connes P. *The association of sickle cell trait with type 2 diabetes severely impair blood rheology and vascular function*. VIIIth International Conference on Clinical Hemorheology. May 24-28, 2015, Seoul, Korea

Millet GP, Debevec T, Saugy JJ, Schmitt L, Cejuela R, **Mury P**, Faiss R, Pialoux V. *Change in performance and oxidative stress after "Living High Training Low" in hypobaric vs normobaric hypoxia.* Hypoxia International Symposia, Lake Louise, AB, Canada, March 2015

PARTIE 7 –

ANNEXES

ANNEXE 1

Susceptibility to chronic social stress increases plaque progression, vulnerability and platelet activation

Giannarelli C, Rodriguez DT, Zafar MU, Christoffel D, Vialou V, Peña C, Badimon A, Hodes GF, Mury P, Rabkin J, Alique M, Villa G, Argmann C, Nestler EJ, Russo SJ, Badimon JJ.

Thromb Haemost. 2017 Apr 3; 117(4): 816-818

Author Manuscript
Author Manuscript
Author Manuscript
Author Manuscript

HHS Public Access
Author manuscript
Thromb Haemost. Author manuscript; available in PMC 2017 June 29.

Published in final edited form as:
Thromb Haemost. 2017 April 03; 117(4): 816–818. doi:10.1160/TH16-10-0817.

Susceptibility to chronic social stress increases plaque progression, vulnerability and platelet activation

Chiara Giannarelli[1,2], **David T. Rodriguez**[1], **M. Urooj Zafar**[1], **Daniel Christoffel**[3], **Vincent Vialou**[3], **Catherine Peña**[3], **Ana Badimon**[3], **Georgia F. Hodes**[3], **Pauline Mury**[1], **Jacklyn Rabkin**[3], **Matilde Alique**[1], **Giulia Villa**[1], **Carmen Argmann**[2], **Eric J. Nestler**[3], **Scott J. Russo**[3], and **Juan J. Badimon**[1]

[1]Atherothrombosis Research Unit, Zena and M. A. Wiener Cardiovascular Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA

[2]Department of Genetics and Genomic Sciences, The Icahn Institute for Genomics and Multi-scale Biology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA

[3]Fishberg Department of Neuroscience and Friedman Brain Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA

Dear Sirs

Atherosclerotic cardiovascular disease (CVD) causes nearly 17.5 million deaths per year, a number that is projected to increase significantly within the next two decades (1). Depression – the most common mental illness in the United States affecting up to 20 % of Americans during their lifetime (2, 3) – has been associated with 2.7-fold increased risk of acute myocardial infarction (AMI) (4) and two- to four-fold higher risk of mortality after a cardiac event (5–7). However, whether depression *per se* directly influences atherosclerotic CVD or is simply a co-morbidity remains unknown. In fact, most research effort in the field has concentrated on the effects of chronic stress on atherosclerosis (8–11), with no focus on depression-like symptoms–mostly because of the paucity of animal models that accurately reflect symptoms of affective disorders like depression. These studies have shown that chronic stress–a known risk factor for depression (6, 12–14) – affects atherosclerotic lesion progression, composition (8–10) and even myocardial infarction and sudden death in ApoE$^{-/-}$ mice (11). However, no direct proof that depression affects atherosclerosis either *in vivo* or in humans exists. In the present study – using a validated and standardised protocol of chronic social defeat stress that results in a measurable depression-like phenotype in mice (15) – we tested the effect of depression on atherosclerotic plaque progression and

Correspondence to: Chiara Giannarelli, MD, PhD, Cardiovascular Research Center, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029, USA, Tel.: +1 212 241 4984, Fax: +1 212 426 6962, chiara.giannarelli@mssm.edu; Juan J. Badimon, PhD, AtheroThrombosis Research Unit, Cardiovascular Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029, USA, Tel.: +1 212 241 8484, Fax: +1 212 426 6962, juan.badimon@mssm.edu.

Supplementary Material to this article is available online at www.thrombosis-online.com.

Conflicts of interest

Dr. Eric Nestler is Consultant for Merck Research Laboratories and had a research grant from J&J in the past five years. Dr. Scott Russo has received funding from Janssen Pharmaceuticals to study inflammation and depression. The other authors have no conflict to disclose.

Author Manuscript Author Manuscript Author Manuscript Author Manuscript

composition and on platelet reactivity, all factors that contribute to the onset of myocardial infarction and stroke in humans.

Male ApoE$^{-/-}$ mice on C57Bl/6 background were fed a high-fat diet and exposed to chronic social defeat stress (15). Details of Methods can be found in the Supplementary Material available online at www.thrombosis-online.com.

To test the hypothesis that depression directly affects atherosclerosis, ApoE$^{-/-}$ mice on high-fat diet were subjected to chronic social defeat stress (15, 16). This model leads to the development of marked social avoidance associated with a constellation of overlapping behavioral and physiological changes reminiscent of depressive-like phenotype (16) (see Methods in the Supplementary Material available online at www.thrombosis-online.com). Using this protocol, social avoidance – measured as social interaction (SI) score, defined as the ratio of total time spent by the mouse in the interaction zone during each social interaction test session when the target is absent or present – is automatically captured using a robust method that ensures reproducibility and quantitative analysis of the depression-like phenotype in mice (15). ▶ Figure 1A shows the spectrum of avoidance behavior in our cohort of mice subjected to chronic social defeat and divided between depression-like (susceptible: S) and resilient (R) phenotypes as a function of their social interaction (SI) score (see Methods in the Supplementary Material available online at www.thrombosis-online.com). The scores of control (C) animals, on high fat diet but unexposed to chronic social defeat stress, are also shown. Plasma cholesterol (S: 2042 ± 404 mg/dl; C: 2070 ± 262 mg/dl), LDL (S: 1428 ± 345 mg/dl; C: 1375 ± 175 mg/dl), HDL (S: 522 ± 64 mg/dl; C: 592 ± 99 mg/dl) or triglyceride (S: 458 ± 29 mg/dl; C: 521 ± 27 mg/dl) did not differ between groups. S mice showed increased platelet aggregation versus control mice when stimulated with serotonin:epinephrine (5HT:EPI) at 24 hours after social defeat. In contrast, platelet reactivity to 5HT:EPI was not significantly different between S and C mice at six months (▶Figure 1B), suggesting that the effect seen acutely after chronic social defeat exposure does not persist in the long term. Both control and susceptible ApoE$^{-/-}$ mice showed the development of atherosclerotic lesions after six months of atherogenic diet. Analysis of aortic root sections by Oil Red-O staining revealed increased lipid accumulation in lesions of S versus C mice (▶Figure 1C), suggesting a direct effect of depression on plaque progression and composition. We also found a negative correlation between Oil Red-O staining (% of stained area) and SI score (r: −0.79; p-value: 0.0005), indicating a direct correlation between the severity of depression-like symptoms and degree of lipid accumulation in the arterial wall. To investigate whether depression promotes the development of lesions with features of plaque vulnerability, we examined their cellular composition. We found increased plaque macrophage (MOMA-2+ cells) density in the lesions of S versus C mice (▶Figure 1D) and, similarly to lipid accumulation, an inverse correlation between MOMA-2+ density and SI score (r: −0.41; p-value: 0.03). These observations further suggest that the severity of depression-like symptoms seems to directly affect the degree of plaque macrophage infiltration. On the other hand, no differences in vascular smooth muscle cell density (S: 26.8 ± 7.6 %; C: 26.7 ± 8.7 % stained area; P=NS) or plaque fibrosis (S: 42.6 ± 13.4 %; C: 38.3 ± 3.1 % stained area; P=NS) were observed between groups. To explore the effects of depression on plaque inflammation, we profiled the expression of 96 inflammation-related genes in the atherosclerotic aortas of S and C

Author Manuscript Author Manuscript Author Manuscript Author Manuscript

mice (see Methods in the Supplementary Material available online at www.thrombosis-online.com). Among all differentially expressed genes (▶Figure 1E), CCR6 (4.7 fold-increase), CCL19 (2.1 fold-increase), CCL5 (2.5 fold-increase) and CXCL13 (2.3 fold-increase) – selected for their known effects on atherosclerosis (17–20) – were additionally validated by qualitative PCR in S and C mice. Results confirmed the up-regulation of CCR6 (2.6 fold-increase), CCL19 (2.0 fold-increase), CCL5 (3.1 fold-increase) and CXCL13 (1.7 fold-increase) in the aorta of atherosclerotic S mice versus C (▶Figure 1E).

Using a validated and reproducible model of chronic social defeat we have shown that the development of depression-like symptoms increases platelet aggregation and atherosclerosis in ApoE$^{-/-}$ mice on high-fat diet. The results of this study provide strong evidence of a causal effect of depression on blood thrombogenicity and plaque vulnerability, two of the main components of Virchow's triad. As we previously reported in CAD patients with depression symptoms (21), we observed platelet hyperactivity to serotonin and epinephrine combination as agonist. These observations confirm a critical role of serotonergic and adrenergic pathways in mood disorders and cardiovascular disease (21–23). Aortic root histological analysis revealed a significant increase in lipid deposition and macrophages infiltration–well-established markers of plaque instability (24) – in susceptible mice versus controls. A pro-atherosclerotic inflammatory profile was identified when gene expression of 96 cytokines and receptors was tested in the atherosclerotic aortas of S versus C mice. We found that four cytokines, implicated in the progression of atherosclerosis (CCR6, CCL19, CCL5 and CXCL13) (17, 19, 20) were up-regulated in the atherosclerotic lesions of susceptible mice versus controls. These results are notable given that heightened systemic inflammation has been shown to directly regulate depression-like behaviors in susceptible mice (25) and may represent a shared risk factor in the comorbidity of depression and CVD risk. Together, these results indicate that depression-like phenotype not only promotes a prothrombotic state acutely after chronic stress in atherosclerotic mice, but also the development of features of plaque instability and a pro-atherogenic inflammatory phenotype in the long term. In conclusion, the results of this proof-of-concept study suggest a causal link between depression and atherosclerosis in patients with overt, or at high risk of, atherosclerotic cardiovascular disease.

Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

Acknowledgments

We acknowledge support from K23HL111339, R03HL135289, R21TR001739 to CG and from P50MH096890 to EJN and from the Fondation Leducq Transatlantic Network of Excellence Award (CAD Genomics) to CG.

References

1. Laslett LJ, Alagona P Jr, Clark BA 3rd, et al. The worldwide environment of cardiovascular disease: Prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: A report from the american college of cardiology. J Am Coll Cardiol. 2012; 60:S1–49. [PubMed: 23257320]

Author Manuscript Author Manuscript Author Manuscript Author Manuscript

2. Greenberg PE, Kessler RC, Birnbaum HG, et al. The economic burden of depression in the united states: How did it change between 1990 and 2000? J Clin Psychiatry. 2003; 64:1465–1475. [PubMed: 14728109]
3. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. Nature. 2008; 455:894–902. [PubMed: 18923511]
4. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the interheart study): Case-control study. Lancet. 2004; 364:937–952. [PubMed: 15364185]
5. Lesperance F, Frasure-Smith N. Depression in patients with cardiac disease: A practical review. J Psychosomatic Res. 2000; 48:379–391.
6. Kubzansky LD, Koenen KC, Jones C, et al. A prospective study of posttraumatic stress disorder symptoms and coronary heart disease in women. Health Psychol. 2009; 28:125–130. [PubMed: 19210026]
7. Joynt KE, Whellan DJ, O'Connor CM. Depression and cardiovascular disease: Mechanisms of interaction. Biol Psych. 2003; 54:248–261.
8. Najafi AH, Aghili N, Tilan JU, et al. A new murine model of stress-induced complex atherosclerotic lesions. Dis Modeles Mechanisms. 2013; 6:323–331.
9. Kumari M, Grahame-Clarke C, Shanks N, et al. Chronic stress accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein e deficient mouse. Stress. 2003; 6:297–299. [PubMed: 14660062]
10. Heidt T, Sager HB, Courties G, et al. Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells. Nature Med. 2014; 20:754–758. [PubMed: 24952646]
11. Roth L, Rombouts M, Schrijvers DM, et al. Chronic intermittent mental stress promotes atherosclerotic plaque vulnerability, myocardial infarction and sudden death in mice. Atherosclerosis. 2015; 242:288–294. [PubMed: 26233915]
12. Jiao Z, Kakoulides SV, Moscona J, et al. A. Effect of hurricane katrina on incidence of acute myocardial infarction in new orleans three years after the storm. Am J Cardiol. 2012; 109:502–505. [PubMed: 22154089]
13. Gautam S, Menachem J, Srivastav SK, et al. Effect of hurricane katrina on the incidence of acute coronary syndrome at a primary angioplasty center in new orleans. Disaster Med Public Health Preparedness. 2009; 3:144–150.
14. Boscarino JA. A prospective study of ptsd and early-age heart disease mortality among vietnam veterans: Implications for surveillance and prevention. Psychosomatic Med. 2008; 70:668–676.
15. Golden SA, Covington HE 3rd, Berton O, Russo SJ. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. Nature Protocols. 2011; 6:1183–1191. [PubMed: 21799487]
16. Krishnan V, Han MH, Graham DL, et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. Cell. 2007; 131:391–404. [PubMed: 17956738]
17. Cai W, Tao J, Zhang X, et al. Contribution of homeostatic chemokines ccl19 and ccl21 and their receptor ccr7 to coronary artery disease. Arterioscl Thromb Vasc Biol. 2014; 34:1933–1941. [PubMed: 24990231]
18. Smedbakken LM, Halvorsen B, Daissormont I, et al. Increased levels of the homeostatic chemokine cxcl13 in human atherosclerosis – potential role in plaque stabilization. Atherosclerosis. 2012; 224:266–273. [PubMed: 22840692]
19. Wan W, Lim JK, Lionakis MS, et al. Genetic deletion of chemokine receptor ccr6 decreases atherogenesis in apoe-deficient mice. Circulation Res. 2011; 109:374–381. [PubMed: 21680896]
20. Zernecke A, Weber C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. Cardiovas Res. 2010; 86:192–201.
21. Zafar MU, Paz-Yepes M, Shimbo D, et al. Anxiety is a better predictor of platelet reactivity in coronary artery disease patients than depression. Eur Heart J. 2010; 31:1573–1582. [PubMed: 20097703]
22. Ressler KJ, Nemeroff CB. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. Depression Anxiety. 2000; 12(Suppl 1):2–19. [PubMed: 11098410]
23. Wulsin LR, Singal BM. Do depressive symptoms increase the risk for the onset of coronary disease? A systematic quantitative review Psychosomatic Med. 2003; 65:201–210.

Author Manuscript Author Manuscript Author Manuscript Author Manuscript

24. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, et al. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. Curr Opin Lipidol. 1996; 7:330–335. [PubMed: 8937525]

25. Hodes GE, Pfau ML, Leboeuf M, et al. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. Proc Natl Acad Sci USA. 2014; 111:16136–16141. [PubMed: 25331895]

Author Manuscript
Author Manuscript
Author Manuscript
Author Manuscript

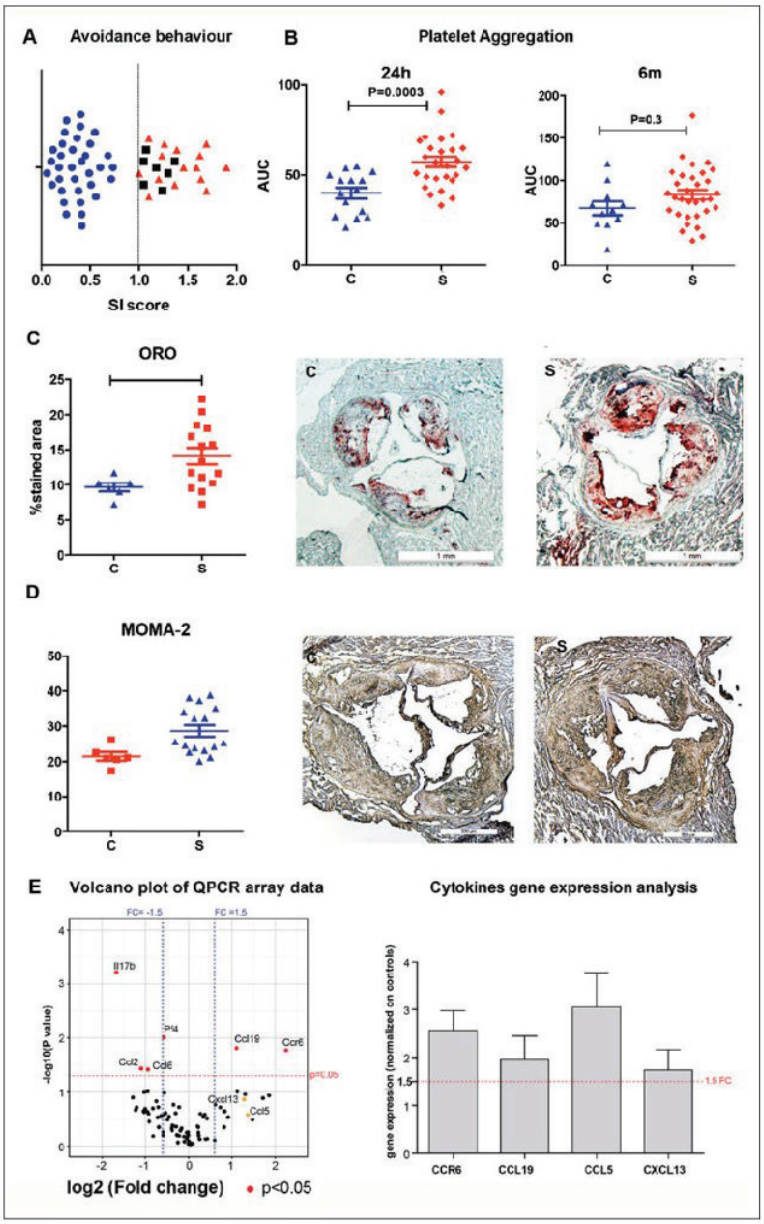


Figure 1.

A) Spectrum of avoidance behaviour. Susceptible (S, blue dots; n=33), resilient (R, black squares; n=7) and Control mice (C, red triangles; n=15) are shown. **B) Platelet reactivity to serotonin and epinephrine (5HT:EPI) at 24 hours and 6 months after social defeat**. 24h = 24 hours, 6m = 6 months. **C) Oil Red O staining: quantification (left) and representative aortic root sections of C and S mice (right)**. Magnification 25×. Scale Bar: 1 mm. **D) Quantification of MOMA-2 immunostaining (left)**. Representative sections from C and S mice (right). Magnification 50×. Scale Bar 500 μm. **E) Volcano Plot of qPCR**

ANNEXE 2

Oxidative stress and inflammation, key targets of the vulnerable atherosclerotic plaque: potential impact of physical activity

Mury P, Chirico EN, Mura M, Millon A, Canet-Soulas E, Pialoux V.

Soumis dans Sports Medicine. (IF_{2017} = 6,83)

Authors: Pauline Mury[1,2]*, Erica N. Chirico[3]*, Mathilde Mura[1,2], Antoine Millon[4,5], Emmanuelle Canet-Soulas[4], Vincent Pialoux[1,2,6]

Title: Oxidative stress and inflammation, key targets of the vulnerable atherosclerotic plaque: potential impact of physical activity

Affiliations:

[1]*Univ Lyon, University Claude Bernard Lyon 1, Interuniversity Laboratory of Human Movement Biology EA7424, team Vascular biology and Red Blood Cell, Villeurbanne, France*

[2]*Laboratory of Excellence GR-Ex, Paris, France*

[3]*Cooper Medical School of Rowan University, Department of Biomedical Sciences, Camden, New Jersey, USA*

[4]*Univ Lyon, University Claude Bernard Lyon 1, CarMeN Laboratory, INSERM U1060, Bron, France.*

[5]*Department of Vascular Surgery, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France*

[6]*Institut Universitaire de France*

*these authors equally contributed to this work.

Corresponding author: Vincent Pialoux, PhD
Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1,
LIBM EA7424, Campus La Doua, Bat Raphael Dubois,
27-29 bd du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex, France
Tel: +33 4 72 43 16 25
e-mail : vincent.pialoux@univ-lyon1.fr

Short Title: Physical activity on oxidative stress and inflammation in atherosclerosis

ABSTRACT

Atherosclerosis is a complex cardiovascular disease which is the leading cause of mortality and morbidity worldwide. Oxidative stress and inflammation are both involved in the development of atherosclerotic plaque by increasing biological processes associated with this pathology such as endothelial dysfunction, macrophages recruitment, and adhesion. Atherosclerotic plaque rupture leading to major ischemic events is the result of vulnerable plaque progression, which is a result of the detrimental effect of oxidative stress and inflammation on risk factors of atherosclerotic plaque rupture, such as intraplaque hemorrhage, neovascularization and fibrous cap thickness. Thus, both are key targets for primary and secondary interventions. It is well recognized that chronic physical activity attenuates oxidative stress in healthy subjects via the improvement of antioxidant enzymes capacities, and inflammation via the enhancement of anti-inflammatory molecules. Moreover, it was recently shown that chronic physical activity could decrease oxidative stress and inflammation in atherosclerotic patients. The aim of this review is to summarize the role of oxidative stress and inflammation in atherosclerosis, and the results of therapeutic interventions targeting them in both preclinical and clinical studies. The effects of chronic physical activity on these two key processes are then reviewed in vulnerable atherosclerotic plaques in both coronary and carotid arteries.

Key Points:

- Oxidative stress and inflammation are two interlinked processes involved in the atherosclerotic disease development such as endothelial dysfunction, macrophages recruitment, and adhesion, and in vulnerable plaque progression such as intraplaque hemorrhage, neovascularization, and fibrous cap thickness. Both are targets for therapy in both primary and secondary intervention.
- Chronic physical activity can attenuate oxidative stress and inflammation in atherosclerotic patients, leading to a potential reduction in pathophysiological complications. Whereas its impact is well documented for primary care, it is less clear after an event such as stroke.

INTRODUCTION

Atherosclerosis is the leading cause of death, morbidity and long-term adult disability worldwide. Depending on the localization of the atherosclerotic plaques (aortic, coronary, femoral, or carotid arteries), atherosclerosis may lead to myocardial infarction, angina pectoris, aortic aneurysm, peripheral arterial disease, or stroke (Semple 1953; Kampmeier 1969). Atherosclerosis is no longer thought of as a disease ridden by fatty deposits on artery walls. It is a complex cardiovascular disease (CVD) that involves multiple factors including endothelial dysfunction, oxidized low-density lipoproteins, inflammation, and oxidative stress. The complex mechanisms of atherosclerosis are exacerbated by certain modifiable factors such as diabetes, obesity, dyslipidproteinemia, hypertension, smoking, and inactivity or by non-modifiable factors such as age, sex, and genetic predispositions.

Oxidative stress and inflammation are shown to play a central role in the development of the atherosclerotic plaque, as well as in the progression and complications processes. Oxidative stress is associated with systemic inflammation, endothelial cell proliferation and apoptosis, and vasoconstriction, which contribute to endothelial dysfunction leading to atherosclerosis (Montezano and Touyz 2012). In primary prevention, lifestyle interventions such as diet or physical activity (PA) prescriptions have been shown to improve oxidant/antioxidant balance and decrease the overall CVD risk. After an initial event, secondary care aims at stabilizing plaques and most new therapeutic targets are aimed at reducing oxidative stress and inflammation. Indeed, the first positive large scale clinical study with an anti-inflammatory treatment (targeting IL1-β) has just been shown to significantly decrease recurrent cardiovascular events (Ridker et al. 2017).

In addition, it is well known that PA can attenuate oxidative stress and inflammation and thus potentially slow down the progression of atherosclerotic plaque formation. Therefore, the aim of this review is to discuss (i) oxidative stress and inflammation in atherosclerosis progression and the plaque rupture processes and (ii) the potential beneficial effect of exercise training on these mechanisms in primary care and on risk factors of plaque vulnerability after an initial CVD event to avoid recurrence.

I - MECHANISMS OF ATHEROSCLEROTIC PLAQUE PROGRESSION INVOLVING OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION

1. Targeting oxidative stress and inflammation in primary care

Atherosclerosis is a condition plagued by an overwhelming systemic increase in oxidative stress and inflammation. In a vicious circle, atherosclerosis also further generates products of oxidative stress and inflammation. Studies have shown the relationships between atherosclerosis and its risk factors, such as hypercholesterolemia, smoking, and inactivity in the overproduction of oxidative stress and inflammation (Libby et al. 2002b; Taleb 2016). The major components involved in oxidative stress and inflammation in

atherosclerosis include immune cells, such as macrophages, cytokines, lipids, endothelial cell function and activation, adhesion, and smooth muscle cell proliferation and transformation.

1.1 Role of oxidative stress and inflammation in macrophages phenotype modulation

Macrophages play a key role in both the initiation and progression of atherosclerosis. Macrophages contribute to the oxidative and inflammatory local environment through the production of reactive oxygen species (ROS) and cytokines. As extensively reviewed recently, there are several different populations of macrophages with diverse functions and specific responses adapting to a specific microenvironment. In vitro studies have defined two major macrophage classes involved in atherosclerosis including M1 (classical activation) and M2 (alternative activation) macrophages. M1 macrophages are typically considered pro-inflammatory as they produce interleukins such as IL-12, IL-6, IL-1, and TNFα, and express cytokine receptors such as IL-1R on the plasma membrane surface. M2 macrophages are alternatively activated in response to IL-4, IL-10 and IL-13. These cells strongly express scavenger, mannose, and galactose receptors and express anti-inflammatory markers that are distinct in mice and in humans (Murray et al. 2014). In mice, Arginase 1, Ym1 and Ym2, Fizz1, are the more commonly studied, and in humans, mannose receptor C-type 1 (Gordon and Martinez 2010).

The classical view is that a delicate balance must exist between M1 and M2 macrophages in order to initiate proper healing. Atherosclerosis is viewed as an unresolved reactivation of these dynamic processes. In atherosclerosis, there is a chronic imbalance in macrophage differentiation leading to a predominance of M1 over M2 macrophages, ultimately altering the phagocytic activity. Some studies have determined the plasticity of macrophages by demonstrating their ability to switch from one functional phenotype to another in response to the local environment (Stout et al. 2005; Kawanishi et al. 2010). The ratio of accumulated M2/M1 in the atherosclerotic plaques of a mouse model of atherosclerosis ($ApoE^{-/-}$) is inversely proportional to the progression of lesion size (Khallou-Laschet et al. 2010). Yet, in human atherosclerosis, macrophage phenotypes are even more complex and flexible as recently discovered (Xue et al. 2014). Therefore, macrophages are a promising therapeutic target, but translation from mice to human situations still requires more studies (Geeraerts et al. 2017).

In primary prevention, the risk factors for atherosclerosis, such as physical inactivity (Laufs et al. 2005; Kilic-Erkek et al. 2016), smoking (Khanna et al. 2011), and high blood pressure (Ghiadoni et al. 2002; Kim et al. 2017), elicit a highly oxidative and inflammatory response, leading to a more oxidative and inflammatory environment, possibly inducing this change.

NADPH oxidase activity in monocytes/macrophages and its resulting superoxide production contribute to atherosclerotic lesion formation and are strongly correlated with the severity of atherosclerosis (Sorescu et

al. 2002; Beloqui et al. 2017). Both superoxide and monocytes/macrophages can induce low-density lipoprotein oxidation (oxLDL) (Cathcart et al. 1985; Bryk et al. 2017), which results in the unregulated uptake of this lipoprotein by macrophages, leading to foam cell formation.

1.2 Oxidative stress and inflammation contributions to endothelial dysfunction

The endothelium is a single layer of cells that line the luminal surface of blood vessels. Early endothelial dysfunction, which results in impaired nitric oxide (NO) bioavailability leading to reduced vasodilation is thought to occur as a result of accumulating free oxygen radicals.

Superoxide, derived from NADPH oxidase, has been implicated in endothelial dysfunction (Guzik et al. 2000; Li and Pagano 2017). Numerous studies indicate that direct inactivation of NO by $O_2^{\cdot-}$ represents a key event responsible for impaired NO bioactivity (Gryglewski et al. 1986; Rubanyi et al. 1986). As superoxide is able to decrease the availability of NO, an important anti-atherosclerotic regulator of vascular tone and blood flow, an increase in antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) may improve the outcomes of atherosclerosis. Exogenous SOD improves NO-induced vascular relaxation (Gryglewski et al. 1986) and improves NO-mediated arterial relaxation in atherosclerotic animals (Mügge et al. 1991).

In addition, the reaction of NO and $O_2^{\cdot-}$ results in the generation of peroxynitrite, a powerful and highly reactant oxidant. Peroxynitrite may trigger apoptosis in endothelial cells leading to a vascular pathophysiology (Mihm et al. 2000; Dickhout et al. 2005). It may also contribute to the development of early lesions and create reactive nitrogen species that further progresses lesions (Pacher et al. 2007; Sigala et al. 2010). Peroxynitrite is able to regulate signaling pathways in the endothelium, modifying the vascular response to atherogenic stimuli (Go et al. 1999; Ewart et al. 2014). Vendrov (Vendrov et al. 2007) et al, showed that NADPH oxidase knockout mice display decreased peroxynitrite production and delayed vascular remodeling in response to an increase in shear stress.

Endothelial NO synthase (eNOS) can produce superoxide rather than NO if there is a deficiency of either cofactor tetrahydrobiopterin (BH_4) or L-arginine. A lack of BH_4, which occurs through its oxidation by peroxynitrite, causes an electron flow interruption through the eNOS domain, leading to the generation of superoxide over NO (Cosentino et al. 2008; Chuaiphichai et al. 2017). Treatment of BH_4 to patients with hypercholesterolemia or hypertension successfully restored endothelial function, emphasizing the role of eNOS uncoupling as a major player in vascular disease (Higashi et al. 2002, 2006; Chuaiphichai et al. 2017). The importance of NO in endothelial homeostasis is evident in eNOS knockout mice that develop defective vascular remodeling and enhanced vascular thrombosis (Rudic et al. 1998). It is further demonstrated that eNOS deficiency in atherosclerotic prone mice accelerates lesion formation (Kuhlencordt et al. 2001; Li and Förstermann 2013).

Myeloperoxidase, an enzyme expressed most abundantly in neutrophils, is able to produce hypochlorous acid from H_2O_2 during the neutrophilic respiratory burst. In addition, it can consume NO and compete with L-arginine within the eNOS complex. Levels of myeloperoxidase have been shown to be a strong and independent marker of endothelial dysfunction (Vita et al. 2004; Tian et al. 2017).

Xanthine oxidase produces $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2. Diseased human vessels from patients with coronary artery disease (CAD) show an increased production of $O_2^{\cdot-}$, resulting from an enhanced expression and activity of xanthine oxidase (Spiekermann et al. 2003). Vasodilation is improved in patients with hypercholesterolemia (Cardillo et al. 1997; Okafor et al. 2017), CAD (Spiekermann et al. 2003; Baldus et al. 2005; Okafor et al. 2017), and chronic heart failure (Farquharson et al. 2002; George et al. 2006; Okafor et al. 2017) when xanthine oxidase production is inhibited by the addition of allopurinol or oxypurinol.

1.3 Role of oxidative stress and inflammation on adhesion

An early stage of atherosclerosis involves the recruitment of circulating inflammatory cells into the intimal space. This process is mediated by cellular adhesion molecules (CAMs) which are expressed on the vascular endothelium and on circulating leukocytes, especially monocytes, during an inflammatory response. The abnormal interaction that develops during the progression of atherosclerosis involves platelets, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and E- and P-selectin.

Activated platelets may contribute to lesion formation, as they expedite the migration of inflammatory cells to lesion sites and release pro-inflammatory cytokines and chemoattractant (Li et al. 2011). Platelet adhesion may be an initiating event in atherosclerosis, as it has been shown to occur before leukocyte recruitment to the arterial wall and precedes activation of NF-kB, VCAM-1, and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) (Massberg et al. 2002; Ed Rainger et al. 2015). It has been demonstrated in vitro that platelets trigger the secretion of chemokines, express adhesion molecules, and promote adherence of leukocytes in endothelial cells (Henn et al. 1998; Gawaz et al. 1998; Ed Rainger et al. 2015; Ahmadsei et al. 2015). The release of inflammatory mediators forms an inflammatory environment that can lead to cell activation and cell recruitment. In vivo, platelet recruitment occurred at lesion-prone sites.

Cell adhesion molecule P-selectin is located on the surface of activated platelets, as well as on activated endothelial cells . Activated platelets in the circulation are able to initiate an acute inflammatory response by initiating P-selectin expression on endothelium and stimulate leukocyte rolling on vessel wall. P-selectin, in combination with E-selectin (located on endothelial cells) has been shown to increase with the level of severity of atherosclerosis in humans (Lu et al. 2010; Sadowski et al. 2014). A deficiency of both P- and E- selectin was shown to reduce aortic sinus fatty streaks, delay lesion expansion, and reduce

184 calcification in LDLR deficient mice (Dong et al. 1998). Moreover, injections of P-selectin-expressing
185 platelets into ApoE$^{-/-}$ mice accelerated the development of lesions (Huo et al. 2003).

186 VCAM-1 and ICAM-1 are both cytokine-inducible immuno-globin gene superfamily members that are
187 expressed by the aortic endothelium in areas predisposed to atherosclerosis (Nakashima et al. 1998; Iiyama
188 et al. 1999). These molecules not only assist in the attachment of blood cells, but also signal the recruitment
189 of other blood cells. The inhibition of VCAM-1 and ICAM-1 was shown to slow down the progression of
190 atherosclerosis, suggesting their implication in the pathology (Srivastava et al. 2015).VCAM-1 seems to
191 have a predominate role in lesion initiation (Cybulsky et al. 2001; Dansky et al. 2001), while other studies
192 have found that ICAM-1 has a larger role in mature lesion progression (Collins et al. 2000; Bourdillon et
193 al. 2000). In addition, serum levels of both VCAM-1 and ICAM-1 have been associated with increasing
194 levels of disease severity (Rubio-Guerra et al. 2010; Lu et al. 2010). In young adults with advanced
195 atherosclerotic plaque, intima-media thickness was associated with higher levels of sICAM-1. It was also
196 shown that higher than average sICAM-1 levels corresponded to increased carotid artery stenosis and
197 coronary artery calcification (Gross et al. 2012).

198 **II - MECHANISMS OF ATHEROSCLEROTIC PLAQUE VULNERABILITY**

199 **1. Concepts of plaque vulnerability and plaque rupture**

200 The concept of vulnerable plaques reflects the susceptibility of plaques to complications leading to plaque
201 rupture. Vulnerability of plaque are related to a specific morphology and composition (Figure 1), which
202 were defined (Stary et al. 1995) and understood due to histological studies (Burke et al. 1997). This concept
203 of degree of vulnerability according to composition of plaque is recently supported by Badimon and
204 Vilahur (Badimon and Vilahur 2014).

205 The first morphological characteristic of unstable plaques is the presence of a thin fibrous cap (vs. thickness
206 over 200µm (Redgrave et al. 2008; Pelisek et al. 2012)) covering a large lipid-rich necrotic core both
207 induced by accumulation of macrophages deaths and inflammation (Mughal et al. 2011). An area over 25%
208 of fibrous cap disruption is associated with a higher risk of plaque rupture (Saba et al. 2010; Marnane et al.
209 2014). A larger area of lipid-rich necrotic core is significantly associated with future ischemic events
210 (Takaya et al. 2006; Mono et al. 2012). Intraplaque hemorrhage (IPH) represents the major determining
211 factor of plaque instability (Michel et al. 2011b) and is associated with future ischemic events (Takaya et
212 al. 2006; Gao et al. 2007; Turc et al. 2012). IPH accelerates plaque progression by increasing lipid-rich
213 necrotic core and plaque volume due to accumulation of cholesterol-rich red blood cell membranes (Michel
214 et al. 2011a) and results from rupture and leakage from immature neovessels (Virmani et al. 2005)
215 presenting a disorganized layer of smooth muscle cells (Dunmore et al. 2007). Eighty percent of the
216 intraplaque *vasa vasorum* network had a weak integrity and was susceptible to leakage (Sluimer et al. 2009)

explaining why neovessels density was higher in ruptured plaques (Fleiner et al. 2004; Saito et al. 2014) (Figure 1). These attributes and events following plaque rupture are generally absent in animal models (Millon et al. 2014).

1.1 Analogies and differences between coronary and carotid atherosclerosic plaque vulnerability

Even though coronary and carotid atherosclerosis lead to different complications (respectively myocardial infarction or stroke), plaques at these two locations present similar morphology (Rothwell et al. 2000; Honda et al. 2004) suggesting that similar systemic factors may influence their development. Cardiovascular risk factors such as diabetes mellitus, hypertension, smoking, age, or altered lipid profile are involved in the development of both carotid and coronary atherosclerosis (Kannel 1994). However, Kannel reported that some of these cardiovascular risk factors could have a more important influence depending on the localization; for example cholesterol levels promote CAD while hypertension promotes ischemic stroke (Kannel 1994).

Chronologically, carotid atherosclerotic plaque development occurs at a later timepoint than coronary plaque illustrating that the presence of severe carotid atherosclerotic plaque in CAD patients is an indication of widespread atherosclerosis (Jashari et al. 2013). So far, one of the criteria of plaque severity is the stenosis percent. The link between carotid artery stenosis and stroke risk showed that a stenosis of 60-69% predicted an 11% risk of stroke within 3 years while a stenosis of 90% predicted a 32% risk. However, coronary artery stenosis did not predict coronary ischemic events (Nicoll and Henein 2013). Indeed, a majority of patients suffering from cardiac ischemic events have a stenosis of less than 50% (Ambrose et al. 1985). Inversely, coronary and carotid plaque share similar mechanisms of plaque rupture including fibrous cap rupture (60% of cases) and plaque erosion (35%) (Brott et al. 2011) (Table 1). However, carotid plaque rupture is less frequently driven by plaque erosion than is coronary plaque rupture (Table 1). Both coronary and carotid plaque present similar anatomical characteristics as detailed in the Table 1 (thin fibrous cap, large lipid-rich necrotic core, intraplaque hemorrhage, and neovascularization). The main difference between carotid and coronary atherosclerotic plaque lays in the ischemic complications following plaque rupture. Indeed, acute coronary syndromes are preferentially due to luminal thrombosis while brain ischemia is mostly due to embolism. Once erosion or rupture happen, necrotic core components are exposed to the blood circulation, leading to the activation of the coagulation cascade and the recruitment of platelets and inflammatory cells, and the subsequent formation of thrombus. Flow velocity and shear forces are more important in large vessels such as carotid arteries than in small vessels such as coronary arteries, which can explain the observed difference in coronary and carotid arteries complications.

Different plaque type distribution occur, according to American Heart Association classification (Stary et al. 1995), depending on vascular territories (Akyildiz et al. 2014). In the carotid artery, there were more

type IV & V lesions than type VII or VIII lesions while in the femoral artery, there were more type VII & VIII lesions than type IV & V lesions (Herisson et al. 2011) suggesting a greater implication of mechanical factors in carotid plaque rupture than in femoral plaque rupture.

2. Role of oxidative stress and inflammation on plaque rupture

The lack of animal models of plaque rupture restricts the possibility to explore systematic mechanisms and molecular processes leading to rupture. Many clinical studies have reported that oxidative stress and inflammation are linked to the risk factors of instability, generating a vicious circle leading to plaque rupture (Dunmore et al. 2007; Sluimer et al. 2008; Pelisek et al. 2012; Chistiakov et al. 2015). Indeed, several authors suggested that the induction of neoangiogenesis was induced by a hypoxic, pro-oxidant, and inflammatory state within the plaque (Dunmore et al. 2007; Sluimer et al. 2008; Pelisek et al. 2012; Chistiakov et al. 2015) in particular by the HIF-1α/VEGF (vascular endothelial growth factor) pathway. From a mechanistic perspective, HIF-1α is upregulated by macrophages (Dunmore et al. 2007; Sluimer et al. 2008), ROS (Brunelle et al. 2005), and oxLDL (Hutter et al. 2013). HIF-1α is known to activate VEGF (Forsythe et al. 1996) that subsequently triggers the formation of neovessels (Ferrara 2009). Indeed, higher levels of VEGF was shown in symptomatic plaques compared to asymptomatic ones (Dunmore et al. 2007). Interestingly, HIF-1α has been described as a global regulator of macrophage and neutrophil inflammatory and innate immune functions (Nizet and Johnson 2009). In turn, HIF-1α expression is upregulated through pathways involving the key immune response regulator NF-κB; highlighting an interdependence of the innate immune and hypoxic responses to infection and tissue damage (Rius et al. 2008).

Moreover, the oxidative and inflammatory environment within the plaque enhanced IPH-releasing heme and iron from red blood cell apoptosis. These releases increase the generation of highly reactive ROS in the necrotic core via Fenton's reaction. The resulting oxidative stress attract neutrophils to the core which further increase oxidative stress by activation of NADPH oxidase and myeloperoxidase (Michel et al. 2011a). Thus, the growth of necrotic core volume is due to intraplaque hemorrhage, as wells as the activation of macrophages and cholesterol content (Takaya et al. 2005). In this context, high levels of ROS play an important role in the growth of the necrotic core. Indeed, oxidation of cell membranes and LDL can lead to cell necrosis and further induction of inflammation and macrophages recruitment (Martinet et al. 2011).

Finally, oxidative stress and inflammation, which are intimately linked, accentuated plaque instability directly and indirectly. Several studies have showed that a thinner fibrous cap was associated with the presence of macrophages, T cells, and metalloproteinase matrix (MMP) in symptomatic plaque vs. asymptomatic plaque (Golledge et al. 2000; Moore and Tabas 2011). Indeed, destabilization is associated with apoptosis of smooth muscle cells on the fibrous cap leading to a reduction in extra cellular matrix

protein production and an increase in plaque inflammation. As a vicious circle, inflammatory cells such as leukocytes can infiltrate the fibrous cap and cause smooth muscle cells apoptosis (Silvestre-Roig et al. 2014). MMP-9 produced by macrophages appear to further weaken the fibrous cap (Gough et al. 2006b). Moreover, the observed macrophages accumulation into the intima induced ROS production via NADPH oxidase and myeloperoxidase. Mechanistically, oxidative stress may be involved in the activation of the inflammasome leading to IL-1β (Dasu et al. 2007). This mechanism can amplify the vicious circle leading to plaque instability, and has recently been demonstrated in patients that targeting of IL1-beta decreases plaque rupture and cardiac events (Ridker et al. 2017).

III - EFFECTS OF EXERCISE TRAINING IN ATHEROSCLEROSIS

1. Effects of exercise training on oxidative stress and inflammation in primary care

Regular aerobic exercise has an important role in the enhancement of vascular and cellular health by improving antioxidant defenses and immune response (He et al. 2016). A study by Bloomer et al (Bloomer and Fisher-Wellman 2008), found that healthy, trained subjects had lower levels of oxidative stress at rest. Most studies demonstrate the reduction in post-exercise oxidative stress in chronically trained subjects (Miyazaki et al. 2001; Elosua et al. 2003b; Radak et al. 2008). Moreover, the beneficial impact of daily PA in oxidative stress was also shown in atherosclerotic disease patients (Gardner et al. 2016, 2017).

During chronic exercise training, cells activate *de novo* synthesis of antioxidant enzymes to limit oxidative stress. SOD, as one of the first antioxidant enzyme to respond to cellular ROS, has often been reported to increase in response to exercise training (Toledo-Arruda et al. 2017). Similarly, the two other main antioxidant enzymes, GPx and catalase, has been shown to be enhanced by chronic PA (Rowiński et al. 2013; Fraile-Bermúdez et al. 2015).

Leisure-time PA, as assessed by questionnaires, was found to be inversely related to levels of inflammation (Ford 2002; Mora et al. 2006; Yu et al. 2009; Palmefors et al. 2014), such as C-reactive protein, plasma fibrinogen concentration, white blood cell count, and adhesion molecules. In addition, PA was also inversely associated with cytokines such as TNF and IL-6 (Pischon et al. 2003; Palmefors et al. 2014). Maintenance of PA over a 10-year follow-up was associated with lower C-reactive protein and IL-6 levels, independent of adiposity (Hamer et al. 2012). However, questionnaires can be misleading, as subjects can easily over- or underestimate their true PA intensity. One study, which did not find a relationship between fitness questionnaires and C-reactive protein, did find that peak oxygen uptake was inversely related to C-reactive protein (Valentine et al. 2009). This coincided with other studies of physical fitness, as assessed by fitness tests that observed an inverse relationship was found with markers of C-reactive protein (Mattusch et al. 2000; LaMonte et al. 2002; Giallauria et al. 2009; Cesari et al. 2013), fibrinogen and white blood cell counts (Giallauria et al. 2009).

2. Effects of exercise training on plaque progression

It is well known that PA has a beneficial effect on CVD, in particular on atherosclerosis (Stein et al. 2015). As chronic exercise training has been shown to have adaptive effects in the body, this section will focus on the effects of habitual exercise training on the main parameters of atherosclerosis development such as LDL, endothelial dysfunction, macrophages recruitment or adhesion process.

2.1 The effects of exercise training on LDL

Circulating LDL is able to permeate the endothelium freely, however at high concentrations oxLDL tends to accumulate within the intima. Exercise training is able to prevent the development of dyslipidemia (Breneman et al. 2016) and to reduce plasma LDL concentration, as seen in healthy subjects (Pigłowska et al. 2016), hypercholesterolemic men (Crouse et al. 1997), and obese women (Greene et al. 2012) and children (Zorba et al. 2011). The improvement in LDL concentration may be dependent upon the ability of high-density lipoprotein (HDL) to effectively clear cholesterol. An increase in HDL is evident in studies comparing trained athletes to sedentary controls (Herbert et al. 1984; Brenes et al. 1986; Ahn and Kim 2016). In addition, even healthy subjects who underwent detraining showed a decrease in HDL concentrations (Nikkilä et al. 1980; Slentz et al. 2007).

LDL can become oxidized by ROS such as myeloperoxidase, 15-LO, and iNOS which is one of the most important initiating events in the development of atherosclerosis. Exercise training has been demonstrated to have a role in the reduction of oxLDL, probably through its regulation of ROS. In a human study, exercise training was able to increase LDL resistance to oxidation and decrease already oxidized LDL (Elosua et al. 2003b). In this context, the beneficial effects of exercise may be due to an increase in antioxidant glutathione reductase (Elosua et al. 2003b). GSH has a role in the management of lipid uptake in advanced lesions (Callegari et al. 2011). This link between glutathione and oxLDL was supported by an *in vitro* study that found the addition of antioxidants to human monocyte derived macrophages inhibited oxLDL-mediated glutathione loss and GAPDH inactivation, and reduced oxLDL uptake in macrophages (Gieseg et al. 2010). In addition, Wang et al. (Wang et al. 2006) found that mild- and moderate-intensity exercise reduced the diminishing effects of oxLDL on SOD and GSH bioavailability.

2.2 The effects of exercise training on endothelial dysfunction

Many studies have demonstrated improvements in endothelial function as a consequence of exercise training in healthy subjects and those with pre-existing endothelial dysfunction in conditions such as CAD, chronic heart failure, and type 2 diabetes (Zoppini et al. 2006). Exercise training mechanically stimulates the endothelium by shear stress which can increase production of NO through eNOS, leading to enhanced vasodilation (Gielen et al. 2011). Potential mechanisms responsible for the functional adaptations of the

endothelium to exercise training include increased prostacyclin and NO bioavailability, and decreased endothelin-1 and angiotensin II (Laughlin et al. 2008).

Clinical and experimental studies have found that exercise training reverses and prevents endothelial dysfunction. In CAD patients, exercise training was shown to correct endothelial dysfunction and improve coronary artery blood flow, by increasing eNOS protein expression (Hambrecht et al. 2000a, 2003; Wesnigk et al. 2016) and decreasing expression of angiotensin II type 1 receptor (Adams et al. 2005).

Exercise training can also prevent NO degradation via a decreased oxidative stress. Exercise training was able to reduce the activity of the oxidative stress generating enzyme NADPHox (La Favor et al. 2016), IFN-γ, and superoxide (Lee et al. 2011). Improvement of exercise-induced vasodilation is often accompanied by up-regulation of SOD (Ookawara et al. 2003). As demonstrated in cultured human aortic endothelial cells, laminar shear stress was able to increase SOD protein content and enzyme activity in a time- and dose-dependent manner (Inoue et al. 1996). The upregulation of SOD by shear-stress could be responsible for the reducing the inhibitory action of O_2^- on NO (Inoue et al. 1996).

2.3 The effects of exercise training on macrophage/leukocyte recruitment

As macrophages are able to change their functional phenotype in response to changes in the environment, it is likely that the improved systemic response to oxidative stress and inflammation due to exercise training would have an effect on macrophage phenotypes. Yakeu et al showed that low-intensity exercise upregulated markers of anti-inflammatory macrophages while downregulating pro-inflammatory markers (Yakeu et al. 2010). This is in agreement with Smith et al who found in patients at risk of ischemic heart disease that the pro-inflammatory cytokines, IFN-g, TNF-a, and IL-1β were decreased by moderate-intensity exercise training, while the anti-inflammatory cytokines, TGF-b, IL-4, and IL-10 were increased (Smith et al. 1999b; Pedersen 2017). In addition, exercise training was able to provide protection against an inflammatory response by altering macrophage response in an immunocompromised mouse model (Kizaki et al. 2008).

In addition to the change in macrophage phenotype (Silveira et al. 2016), the amount of macrophage accumulation within the plaque can affect the severity of atherosclerotic lesions. Exercise decreased macrophage and T-lymphocyte infiltration in adventitia, preserved vascular function in aging C57 mice (Lesniewski et al. 2011).

MMP-9 activity can induce the rupture of advanced atherosclerotic lesions in CAD patients (Hopps and Caimi 2015; Nishiguchi et al. 2016) and was associated with both short and long-term mortality post-stroke (Chan et al. 2012). Exercise training was able to decrease MMP activity in patients with diabetes mellitus, metabolic syndrome, and coronary risk factors, as well as in elderly individuals with preexisting atheroma

(Nascimento et al. 2015). Exercise training was able to reduce the number of macrophages, which occurred with a reduction in MMP-9 areas in plaque (Moustardas et al. 2014). One mechanism to explain the exercise-induced improvement of MMP-9 is via an improvement in oxidative stress: ROS can induce MMP-9 (Soumyarani and Jayakumari 2012) while NO can inhibit it (McCarthy et al. 2008; Kadoglou et al. 2011). This is supported by Shon et al (Shon et al. 2011) that found that a decrease in lipid peroxidation occurred concurrently with a decrease of MMP-9.

2.4 The effects of exercise training on adhesion

A healthy endothelium can limit the abnormal adherence of blood cells to the endothelium. When endothelial cells become activated during inflammatory conditions, they express adhesion molecules such as VCAM-1 and ICAM-1. In animal studies with hypercholesterolemic rabbits, it was found that exercise training reduced the protein expression of adhesion molecules (Palmefors et al. 2014) and iNOS (Krause et al. 2014), leading to an improvement in vaso-relaxation. In response to exercise training, CAMs are less likely to adhere in more physically fit and/or healthy individuals (Kargarfard et al. 2016). This was demonstrated *in vitro* as adhesion of peripheral blood mononuclear cell to HUVEC was reduced in more physically fit subjects than the less-fit subjects in response to a 20-min moderate exercise (Mills et al. 2006). Finally, meta-analysis of the effects of exercise interventions in patients with CAD found VCAM-1 levels to be significantly lower post-intervention (Swardfager et al. 2012).

As mentioned in the previous section, platelets play an important role in the pathogenesis and progression of CVD (Ibrahim and Kleiman 2017). Platelet adhesiveness and aggregability were decreased after an exercise training protocol (Rauramaa et al. 1986; Wang et al. 1995), and these results were reversed during deconditioning (Wang et al. 1995). As high levels of LDL and VLDL increase platelet aggregability and secretions (Surya et al. 1992), it is likely that the improvements in lipoprotein concentrations that occur with exercise training could be responsible for this decrease in platelet activity.

Other possible mechanisms for the improvement in adhesion due to exercise training could be to the result of increased shear stress, decreased oxidative stress, or improved NO bioavailability. By increasing shear stress, exercise likely decreases the expression of VCAM-1 and E-selectin (Chiu et al. 2004). Oxidative stress is closely involved in the regulation of CAM expression. Indeed, superoxide produced from NADPH oxidase has been implicated in increased expression of CAMs (Li et al. 2003) whereas H_2O_2 produces transcription factors such as NF-κB and activator protein-1 (AP-1), which enhance expression of adhesion molecules, such as VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin (Vogiatzi et al. 2009b). Treatment with antioxidants pyrrolidine dithiocarbamate and N-acetylcysteine reduced TNF-α-induced VCAM-1. All together these results suggest that the improvement in antioxidant activity and decrease in oxidative stress associated with exercise could play the same role (Weber et al. 1994). Finally, the increase in NO as a response to exercise

training may limit the expression of VCAM-1, ICAM-1, and platelets as it was shown to regulate these adhesion markers.

3. The effects of exercise training on biological risk factors of rupture

The positive association between exercise training and the reduction of CVD is now well established, in particular for carotid artery stenosis (Stein et al. 2015) and cardiovascular heart disease (Thompson et al. 2003; Schnohr et al. 2017). Many studies have determined that moderate to high levels of PA prevent cardiovascular events (Berlin and Colditz 1990; Rauramaa et al. 1995; Sofi et al. 2008), describing a dose-response relationship (K E Powell et al. 1987; Stamatakis et al. 2009). PA has a protective role in primary and secondary prevention. Moreover, some exercise trials showed regression in the existing lesions (Bowles and Laughlin 2011). Indeed, chronic exercise training has been shown to reduce most of the physiological processes involved in the pathogenesis of CVD (oxidative stress, inflammation, vascular adhesion) (Rush et al. 2005; Pialoux et al. 2009c; Szostak and Laurant 2011), on the contrary to the short-lived response of acute exercise (Elosua et al. 2003b; Delaney and Spark 2016). In addition, the type of activity can differently mediate the development of atherosclerosis markers. Regular practice of a strength sport (weightlifting) was associated with a decrease in flow mediated dilation and an increase in intima-media thickness of the carotid (cIMT) artery, two early markers of atherosclerosis (Agrotou et al. 2013). Conversely, habitual endurance exercise such as marathon running was able to reduce several CVD risk factors (C-reactive protein, blood lipids, cholesterol, body mass index) (Taylor et al. 2014). In addition, it appears that physical inactivity is a potential major atherosclerotic risk factor (Sofi et al. 2008). Prince et al (Prince et al. 2016) showed that cardiovascular heart disease patients spent almost 8 hours a day being sedentary post-cardiac rehabilitation and this was inversely associated with markers of cardiometabolic health as body mass index, blood pressure, triglycerides, HDL and LDL. In addition, exercise combined with diet therapy was more efficient than surgical angioplasty intervention in event free survival in patients with stable cardiovascular heart disease (Hambrecht et al. 2004). All these results confirm the importance of PA in the prevention of atherosclerosis. Bowles and Laughlin (Bowles and Laughlin 2011) hypothesized plausible mechanisms for exercise protection, including improved endothelial function, attenuated plaque progression, and stabilization of vulnerable plaque to prevent plaque rupture, reduce myocardial oxygen demand, decrease thrombosis, and decrease inflammatory mediator release from skeletal muscle and adipose tissue.

Some studies have examined the effects of PA and exercise on biological markers of atherosclerosis to better understand the positive role of PA on the disease. Anatomical parameters as plaque volume, cIMT, or surface roughness, seem to be suitable to predict cardiovascular events as Forbes et al (2016) recently shown a positive association between the reduction in coronary plaque volume and reduction in CVD outcomes. PA was shown to reduce anatomical parameters of plaque by some studies. The percent change

448 in coronary plaque volume and daily PA were significantly negatively correlated (Nishitani-Yokoyama et
449 al. 2015). This was confirmed by Lakka et al (2001) who reported during a 4-year follow-up an inverse
450 association between VO_2max and development of maximal cIMT (Rauramaa et al. 1995), carotid plaque
451 size, and surface roughness, underlying the preventive role of PA on cardiovascular events. Interestingly,
452 Nishitani-Yokoyama et al (2015) did not find a difference in the percent change of plaque volume between
453 symptomatic patients who underwent or abstained from a phase II cardiac rehabilitation that included a 6-
454 months aerobic training.

455 Coronary artery calcification seems to be an important risk factor in atherosclerosis. Desai et al (2004)
456 showed a strong relation between PA and prevalence of advanced calcification in a 779-asymptomatic
457 patient cohort who had more than two metabolic risk factors (hypertension, obesity, hypertriglyceridemia,
458 and low levels of HDL-C). This was recently confirmed in a 2,107 men-cohort study showing that high
459 fitness could attenuate coronary artery calcification and cIMT (Jae et al. 2016). These authors demonstrated
460 an inverse relation between levels of PA and degree of absolute coronary artery calcium, hypothesizing
461 that regular PA reduces metabolic risk factors and so modulate or delay plaque calcification. This result
462 was confirmed by Kwasniewska et al (Kwaśniewska et al. 2014) and Wilund et al (2008) but for men only.

463 The most used anatomical parameter to detect and quantify atherosclerosis is the cIMT. Several studies
464 report that cIMT was able to predict coronary atherosclerosis and found a relationship between them. But,
465 as described by Bots et al (2007), the link appears weak because of the variability of atherosclerosis
466 development and cIMT measurement it shows. Several authors hypothesized that the lifestyle
467 modifications induced by exercise intervention would not be sufficient to limit the progression of the cIMT
468 and atherosclerosis plaque in healthy population (Tanaka et al. 2002; Rauramaa et al. 2004) and in CVD
469 patients (Anderssen et al. 2005; Chan et al. 2006). Tanaka et al (2002) found, in a group of healthy men
470 (18-77 years), that cIMT did not differ between sedentary people and endurance-trained subjects, as
471 confirmed by Gori et al (2015). Gori et al showed that cIMT was related to age and not to the amount of
472 PA per week. A similar study was done in ambulatory patients free from major vascular disease (Schmidt-
473 Trucksäss et al. 1999) or in patients with at risk of cardiovascular heart disease (Ebrahim et al. 1999). It
474 should be noted that in these 3 cross-sectional studies, the assessment of PA was done by self-administered
475 questionnaire. However, few studies evaluated the association between cardiorespiratory fitness and cIMT.
476 Ferreira et al (2003) followed up on VO_2max measurements in a group of 154 subjects from adolescence
477 to adulthood and a group of 118 subjects from young adulthood to adulthood. There was no difference
478 between longitudinal VO2 max and cIMT in either group after adjustment for covariates. Pahkala et al.
479 (2013) did not find an association between fitness (VO_2max) and cIMT in 467 obese 17-year-old
480 adolescents while Kim et al. and Silva et al. (Kim et al. 2011; Silva et al. 2014) reported a significant
481 negative association between these two markers in adolescents. These latter studies raise the question of

using cIMT as relevant marker of the beneficial effect of PA on atherosclerosis development. Interestingly, Gori et al (2015) suggested a physiological adaptation of the peripheral arteries to regular training as demonstrated by a positive correlation between cIMT and systolic blood pressure at rest, confirming the preventive role of the PA.

The effect of exercise on vascular function is well studied. Thompson et al (2003) report a significant reduction of systolic blood pressure and diastolic blood pressure with exercise in a total of 2,674 patients, including normotensive and hypertensive subjects. They observed a threefold-reduction in the blood pressure of hypertensive patients versus normotensive subjects, suggesting PA could be used as treatment. Moreover, the positive effect of regular aerobic exercise on vasomotor function and arterial property, in particular arterial stiffness, is well known (Tanaka et al. 1998). Favorable associations were found between high levels of PA and arterial distensibility and stiffness, in boys (Ried-Larsen et al. 2013) and in male and female young adults (Pälve et al. 2014). Horta et al (2015) showed that in physically active subjects who follow the international recommendation of 30min/day have lower arterial stiffness and that sedentary time was associated with arterial stiffness. In addition, it appears that arterial roughness was more sensitive than cIMT to characterize the modification of arterial wall. Interestingly, Luedemann et al (2002) reported that subjects who never smoked had reduced cIMT, prevalence, and stenosis of plaques in the common carotid artery than smokers. It was also showed that smoking blunted the beneficial effects of PA and diet on atherosclerosis.

Arterial stiffness is one of the consequences of endothelial dysfunction. NO is the main player of the vasomotor tone and function. Coronary atherogenesis is characterized by a progressive impairment of endothelial function due to the NO pathway favoring and maintaining an inflammatory and oxidative environment. It is well known that regular PA improves NO release (Skrypnik et al. 2014) so it could be a potential therapy for endothelial dysfunction. Hambrecht et al (2000a) studied the effect of a 4-week exercise training program on endothelial dysfunction in 19 asymptomatic CAD patients without metabolic risk factors such as diabetes, obesity, hypertension, hypercholesterolemia or cigarette smoking during the previous three months. They found that aerobic exercise improved coronary endothelial function by improving endothelial vasodilation and limiting vasoconstriction in response to acetylcholine. They hypothesized that shear stress could improve expression of NOS in endothelial cells as supported by a study by Corson et al in dogs (1996).

As we have observed across many biomarkers (plaque volume, coronary artery calcification, cIMT, blood pressure, arterial stiffness, endothelial dysfunction), PA has a distinct valuable effect on coronary atherosclerotic plaque in mice and human studies (Thompson et al. 2003; Hambrecht et al. 2004; Desai et al. 2004; Kwaśniewska et al. 2014; Nishitani-Yokoyama et al. 2015; Horta et al. 2015). Inversely, cross-

sectional (Tanaka et al. 2002; Ferreira et al. 2003; Sandrock et al. 2008; Pälve et al. 2014) and interventional studies (Rauramaa et al. 2004; Anderssen et al. 2005; Chan et al. 2006) demonstrate that there is not yet a clear consensus regarding the effects of PA on carotid atherosclerosis. Consequently, more studies are needed to evaluate the beneficial impact of PA on suitable biomarkers of carotid plaque instability.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

As atherosclerosis is the leading cause of death, morbidity, and long-term disability in worldwide, it appears crucial to find new strategies to limit its development. It is well known that PA plays a major role in primary and secondary prevention, in particular on anatomical plaque components like LDL, endothelial function, or macrophage accumulation (Figure 2). Whereas the beneficial impact of PA is clear in coronary atherosclerosis, it still has no consensus on carotid atherosclerosis. Nevertheless, recent observations regarding the impact of PA level on the risk factors for carotid plaque rupture such as thinning of fibrous cap, development of lipid-rich necrotic core, intraplaque hemorrhage or neovascularization suggest that PA may limit the plaque vulnerability compared to sedentary patients. It can be hypothesized that the beneficial effect of PA may be driven, at least partially, by the reduction of inflammation and oxidative stress in the more active patient. Taken together all these results open new challenge for the future research to understand the mechanisms by which PA and exercise training can impact positively plaque rupture risk factors (Figure 2).

Availability of Data and Materials

Not applicable

Funding

No sources of funding were used to assist in the preparation of this article.

Authors' contributions

PM, ENC, ECS and VP participated in design the study; PM, ENC and MM participated in survey of the literature; PM and ENC contributed to the analysis and wrote the manuscript; PM, ENC, MM, AM, ECS, and VP edited the manuscript.

Ethics Approval and Consent to Participate

Not applicable

Consent for Publication

Not applicable

Competing Interests

No disclosures

REFERENCES

1. Semple R. Diabetes and peripheral arterial disease; a clinical study. Lancet. 1953;1:1064–8.

2. Kampmeier RH. Atherosclerosis--its pathogenesis and clinical aspects. South. Med. J. 1969;62:1023–4.

3. Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2012;110:87–94.

4. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. N. Engl. J. Med. 2017;377:1119–31.

5. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation. 2002;105:1135–43.

6. Taleb S. Inflammation in atherosclerosis. Arch Cardiovasc Dis. 2016;109:708–15.

7. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity. 2014;41:14–20.

8. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity. 2010;32:593–604.

9. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. J. Immunol. 2005;175:342–9.

10. Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. Exerc Immunol Rev. 2010;16:105–18.

11. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston A-T, Clement M, et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. PLoS ONE. 2010;5:e8852.

12. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. Immunity. 2014;40:274–88.

13. Geeraerts X, Bolli E, Fendt S-M, Van Ginderachter JA. Macrophage Metabolism As Therapeutic Target for Cancer, Atherosclerosis, and Obesity. Front Immunol. 2017;8:289.

14. Laufs U, Wassmann S, Czech T, Münzel T, Eisenhauer M, Böhm M, et al. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005;25:809–14.

15. Kilic-Erkek O, Kilic-Toprak E, Caliskan S, Ekbic Y, Akbudak IH, Kucukatay V, et al. Detraining reverses exercise-induced improvement in blood pressure associated with decrements of oxidative stress in various tissues in spontaneously hypertensive rats. Mol. Cell. Biochem. 2016;412:209–19.

16. Khanna AK, Xu J, Mehra MR. Antioxidant N-acetyl cysteine reverses cigarette smoke-induced myocardial infarction by inhibiting inflammation and oxidative stress in a rat model. Laboratory Investigation. 2011;92:224–35.

17. Ghiadoni L, Sudano I, Versari D, Virdis A, Magagna A, Salvetti G, et al. P-506: Correlation between oxidative stress and arterial blood pressure. American Journal of Hypertension. 2002;15:216A–216A.

18. Kim M, Yoo HJ, Kim M, Ahn HY, Park J, Lee S-H, et al. Associations among oxidative stress, Lp-PLA2 activity and arterial stiffness according to blood pressure status at a 3.5-year follow-up in subjects with prehypertension. Atherosclerosis. 2017;257:179–85.

19. Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, et al. Superoxide Production and Expression of Nox Family Proteins in Human Atherosclerosis. Circulation. 2002;105:1429–35.

20. Beloqui O, Moreno MU, San José G, Pejenaute Á, Cortés A, Landecho MF, et al. Increased phagocytic NADPH oxidase activity associates with coronary artery calcification in asymptomatic men. Free Radic. Res. 2017;51:389–96.

21. Cathcart MK, Morel DW, Chisolm GM. Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. Journal of Leukocyte Biology. 1985;38:341–50.

22. Bryk D, Olejarz W, Zapolska-Downar D. The role of oxidative stress and NADPH oxidase in the pathogenesis of atherosclerosis. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2017;71:57–68.

23. Guzik TJ, West NEJ, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Vascular Superoxide Production by NAD(P)H Oxidase: Association With Endothelial Dysfunction and Clinical Risk Factors. Circulation Research. 2000;86:e85–90.

24. Li Y, Pagano PJ. Microvascular NADPH oxidase in health and disease. Free Radic. Biol. Med. 2017;109:33–47.

25. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. Am. J. Physiol. 1986;250:H1145-1149.

26. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. Nature. 1986;320:454–6.

27. Mügge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. Circ. Res. 1991;69:1293–300.

28. Mihm MJ, Jing L, Bauer JA. Nitrotyrosine causes selective vascular endothelial dysfunction and DNA damage. J. Cardiovasc. Pharmacol. 2000;36:182–7.

29. Dickhout JG, Hossain GS, Pozza LM, Zhou J, Lhoták Š, Austin RC. Peroxynitrite Causes Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Human Vascular Endothelium Implications in Atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:2623–9.

30. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. Physiol Rev. 2007;87:315–424.

31. Sigala F, Kotsinas A, Savari P, Filis K, Markantonis S, Iliodromitis EK, et al. Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability. J. Vasc. Surg. 2010;52:704–13.

32. Go Y-M, Patel RP, Maland MC, Park H, Beckman JS, Darley-Usmar VM, et al. Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1999;277:H1647–53.

33. Ewart M-A, Kennedy S, Macmillan D, Raja ALN, Watt IM, Currie S. Altered vascular smooth muscle function in the ApoE knockout mouse during the progression of atherosclerosis. Atherosclerosis. 2014;234:154–61.

34. Vendrov AE, Hakim ZS, Madamanchi NR, Rojas M, Madamanchi C, Runge MS. Atherosclerosis Is Attenuated by Limiting Superoxide Generation in Both Macrophages and Vessel Wall Cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27:2714–21.

35. Cosentino F, Hürlimann D, Delli Gatti C, Chenevard R, Blau N, Alp NJ, et al. Chronic treatment with tetrahydrobiopterin reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in hypercholesterolaemia. Heart. 2008;94:487–92.

36. Chuaiphichai S, Crabtree MJ, Mcneill E, Hale AB, Trelfa L, Channon KM, et al. A key role for tetrahydrobiopterin-dependent endothelial NOS regulation in resistance arteries: studies in endothelial cell tetrahydrobiopterin-deficient mice. Br. J. Pharmacol. 2017;174:657–71.

37. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Fukuda Y, Matsuura H, Oshima T, et al. Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. Am. J. Hypertens. 2002;15:326–32.

38. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Kimura M, Noma K, Hara K, et al. Tetrahydrobiopterin improves aging-related impairment of endothelium-dependent vasodilation through increase in nitric oxide production. Atherosclerosis. 2006;186:390–5.

39. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. Journal of Clinical Investigation. 1998;101:731–6.

40. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. Circulation. 2001;104:448–54.

41. Li H, Förstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. Curr Opin Pharmacol. 2013;13:161–7.

42. Vita JA, Brennan M-L, Gokce N, Mann SA, Goormastic M, Shishehbor MH, et al. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. Circulation. 2004;110:1134–9.

43. Tian R, Ding Y, Peng Y-Y, Lu N. Myeloperoxidase amplified high glucose-induced endothelial dysfunction in vasculature: Role of NADPH oxidase and hypochlorous acid. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017;484:572–8.

44. Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Bredt M, Gamez G, Tatge H, et al. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with

coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. Circulation. 2003;107:1383–9.

45. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. Hypertension. 1997;30:57–63.

46. Okafor ON, Farrington K, Gorog DA. Allopurinol as a therapeutic option in cardiovascular disease. Pharmacol. Ther. 2017;172:139–50.

47. Baldus S, Köster R, Chumley P, Heitzer T, Rudolph V, Ostad MA, et al. Oxypurinol improves coronary and peripheral endothelial function in patients with coronary artery disease. Free Radic. Biol. Med. 2005;39:1184–90.

48. Farquharson CAJ, Butler R, Hill A, Belch JJF, Struthers AD. Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. Circulation. 2002;106:221–6.

49. George J, Carr E, Davies J, Belch JJF, Struthers A. High-dose allopurinol improves endothelial function by profoundly reducing vascular oxidative stress and not by lowering uric acid. Circulation. 2006;114:2508–16.

50. Li Z, Yang F, Dunn S, Gross AK, Smyth SS. Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis. Thromb. Res. 2011;127:184–8.

51. Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. J. Exp. Med. 2002;196:887–96.

52. Ed Rainger G, Chimen M, Harrison MJ, Yates CM, Harrison P, Watson SP, et al. The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. Platelets. 2015;26:507–20.

53. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. Nature. 1998;391:591–4.

54. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. Circulation. 1998;98:1164–71.

55. Ahmadsei M, Lievens D, Weber C, von Hundelshausen P, Gerdes N. Immune-mediated and lipid-mediated platelet function in atherosclerosis. Curr. Opin. Lipidol. 2015;26:438–48.

56. Lu H-H, Sheng Z-Q, Wang Y, Zhang L. Levels of soluble adhesion molecules in patients with various clinical presentations of coronary atherosclerosis. Chin. Med. J. 2010;123:3123–6.

57. Sadowski M, Ząbczyk M, Undas A. Coronary thrombus composition: links with inflammation, platelet and endothelial markers. Atherosclerosis. 2014;237:555–61.

58. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. J. Clin. Invest. 1998;102:145–52.

59. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. Nat. Med. 2003;9:61–7.

696 60. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, et al. Patterns of vascular cell adhesion
697 molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic
698 lesions and at sites predisposed to lesion formation. Circ. Res. 1999;85:199–207.

699 61. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1
700 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. Arterioscler.
701 Thromb. Vasc. Biol. 1998;18:842–51.

702 62. Srivastava RAK, Mistry S, Sharma S. A novel anti-inflammatory natural product from Sphaeranthus
703 indicus inhibits expression of VCAM1 and ICAM1, and slows atherosclerosis progression
704 independent of lipid changes. Nutr Metab (Lond). 2015;12:20.

705 63. Dansky HM, Barlow CB, Lominska C, Sikes JL, Kao C, Weinsaft J, et al. Adhesion of Monocytes to
706 Arterial Endothelium and Initiation of Atherosclerosis Are Critically Dependent on Vascular Cell
707 Adhesion Molecule-1 Gene Dosage. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.
708 2001;21:1662–7.

709 64. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not
710 ICAM-1, in early atherosclerosis. J. Clin. Invest. 2001;107:1255–62.

711 65. Bourdillon MC, Poston RN, Covacho C, Chignier E, Bricca G, McGregor JL. ICAM-1 deficiency
712 reduces atherosclerotic lesions in double-knockout mice (ApoE(-/-)/ICAM-1(-/-)) fed a fat or a
713 chow diet. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000;20:2630–5.

714 66. Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular
715 adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in
716 apolipoprotein E-deficient mice. J. Exp. Med. 2000;191:189–94.

717 67. Rubio-Guerra AF, Vargas-Robles H, Serrano AM, Vargas-Ayala G, Rodriguez-Lopez L, Escalante-
718 Acosta BA. Correlation between the levels of circulating adhesion molecules and atherosclerosis
719 in hypertensive type-2 diabetic patients. Clin. Exp. Hypertens. 2010;32:308–10.

720 68. Gross MD, Bielinski SJ, Suarez-Lopez JR, Reiner AP, Bailey K, Thyagarajan B, et al. Circulating
721 soluble intercellular adhesion molecule 1 and subclinical atherosclerosis: the coronary artery risk
722 development in young adults study. Clin. Chem. 2012;58:411–20.

723 69. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A definition of advanced
724 types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from
725 the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart
726 Association. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1995;15:1512–31.

727 70. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque
728 morphology in men with coronary disease who died suddenly. N. Engl. J. Med. 1997;336:1276–
729 82.

730 71. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. J. Intern.
731 Med. 2014;276:618–32.

732 72. Redgrave JN, Gallagher P, Lovett JK, Rothwell PM. Critical cap thickness and rupture in
733 symptomatic carotid plaques: the oxford plaque study. Stroke. 2008;39:1722–9.

734 73. Pelisek J, Eckstein H-H, Zernecke A. Pathophysiological mechanisms of carotid plaque vulnerability:
735 impact on ischemic stroke. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.). 2012;60:431–42.

74. Mughal MM, Khan MK, DeMarco JK, Majid A, Shamoun F, Abela GS. Symptomatic and asymptomatic carotid artery plaque. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2011;9:1315–30.

75. Saba L, Potters F, van der Lugt A, Mallarini G. Imaging of the fibrous cap in atherosclerotic carotid plaque. Cardiovasc Intervent Radiol. 2010;33:681–9.

76. Marnane M, Prendeville S, McDonnell C, Noone I, Barry M, Crowe M, et al. Plaque inflammation and unstable morphology are associated with early stroke recurrence in symptomatic carotid stenosis. Stroke. 2014;45:801–6.

77. Takaya N, Yuan C, Chu B, Saam T, Underhill H, Cai J, et al. Association between carotid plaque characteristics and subsequent ischemic cerebrovascular events: a prospective assessment with MRI--initial results. Stroke. 2006;37:818–23.

78. Mono M-L, Karameshev A, Slotboom J, Remonda L, Galimanis A, Jung S, et al. Plaque characteristics of asymptomatic carotid stenosis and risk of stroke. Cerebrovasc. Dis. 2012;34:343–50.

79. Michel J-B, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. Eur. Heart J. 2011;32:1977–1985, 1985a, 1985b, 1985c.

80. Gao P, Chen Z, Bao Y, Jiao L, Ling F. Correlation between carotid intraplaque hemorrhage and clinical symptoms: systematic review of observational studies. Stroke. 2007;38:2382–90.

81. Turc G, Oppenheim C, Naggara O, Eker OF, Calvet D, Lacour J-C, et al. Relationships between recent intraplaque hemorrhage and stroke risk factors in patients with carotid stenosis: the HIRISC study. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2012;32:492–9.

82. Michel J-B, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. Eur. Heart J. 2011;32:1977–1985, 1985a, 1985b, 1985c.

83. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005;25:2054–61.

84. Dunmore BJ, McCarthy MJ, Naylor AR, Brindle NPJ. Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques. J. Vasc. Surg. 2007;45:155–9.

85. Sluimer JC, Kolodgie FD, Bijnens APJJ, Maxfield K, Pacheco E, Kutys B, et al. Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. J. Am. Coll. Cardiol. 2009;53:1517–27.

86. Fleiner M, Kummer M, Mirlacher M, Sauter G, Cathomas G, Krapf R, et al. Arterial neovascularization and inflammation in vulnerable patients: early and late signs of symptomatic atherosclerosis. Circulation. 2004;110:2843–50.

87. Saito K, Nagatsuka K, Ishibashi-Ueda H, Watanabe A, Kannki H, Iihara K. Contrast-enhanced ultrasound for the evaluation of neovascularization in atherosclerotic carotid artery plaques. Stroke. 2014;45:3073–5.

88. Millon A, Canet-Soulas E, Boussel L, Fayad Z, Douek P. Animal models of atherosclerosis and magnetic resonance imaging for monitoring plaque progression. Vascular. 2014;22:221–37.

776 89. Rothwell PM, Villagra R, Gibson R, Donders RC, Warlow CP. Evidence of a chronic systemic cause
777 of instability of atherosclerotic plaques. Lancet. 2000;355:19–24.

778 90. Honda O, Sugiyama S, Kugiyama K, Fukushima H, Nakamura S, Koide S, et al. Echolucent carotid
779 plaques predict future coronary events in patients with coronary artery disease. J. Am. Coll.
780 Cardiol. 2004;43:1177–84.

781 91. Kannel WB. Risk factors for atherosclerotic cardiovascular outcomes in different arterial territories. J
782 Cardiovasc Risk. 1994;1:333–9.

783 92. Jashari F, Ibrahimi P, Nicoll R, Bajraktari G, Wester P, Henein MY. Coronary and carotid
784 atherosclerosis: similarities and differences. Atherosclerosis. 2013;227:193–200.

785 93. Nicoll R, Henein MY. Arterial calcification: friend or foe? Int. J. Cardiol. 2013;167:322–7.

786 94. Ambrose JA, Winters SL, Arora RR, Haft JI, Goldstein J, Rentrop KP, et al. Coronary angiographic
787 morphology in myocardial infarction: a link between the pathogenesis of unstable angina and
788 myocardial infarction. J. Am. Coll. Cardiol. 1985;6:1233–8.

789 95. Brott TG, Halperin JL, Abbara S, Bacharach JM, Barr JD, Bush RL, et al. 2011
790 ASA/ACCF/AHA/AANN/AANS/ACR/ASNR/CNS/SAIP/SCAI/SIR/SNIS/SVM/SVS guideline
791 on the management of patients with extracranial carotid and vertebral artery disease: a report of
792 the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on
793 Practice Guidelines, and the American Stroke Association, American Association of
794 Neuroscience Nurses, American Association of Neurological Surgeons, American College of
795 Radiology, American Society of Neuroradiology, Congress of Neurological Surgeons, Society of
796 Atherosclerosis Imaging and Prevention, Society for Cardiovascular Angiography and
797 Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of NeuroInterventional Surgery,
798 Society for Vascular Medicine, and Society for Vascular Surgery. J. Am. Coll. Cardiol.
799 2011;57:e16-94.

800 96. Akyildiz AC, Speelman L, Gijsen FJH. Mechanical properties of human atherosclerotic intima tissue.
801 J Biomech. 2014;47:773–83.

802 97. Herisson F, Heymann M-F, Chétiveaux M, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, et al. Carotid and femoral
803 atherosclerotic plaques show different morphology. Atherosclerosis. 2011;216:348–54.

804 98. Sluimer JC, Gasc J-M, van Wanroij JL, Kisters N, Groeneweg M, Sollewijn Gelpke MD, et al.
805 Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic
806 plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. J. Am. Coll. Cardiol. 2008;51:1258–65.

807 99. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Contribution of neovascularization and intraplaque
808 haemorrhage to atherosclerotic plaque progression and instability. Acta Physiol (Oxf).
809 2015;213:539–53.

810 100. Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, et al. Oxygen sensing
811 requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. Cell Metab. 2005;1:409–14.

812 101. Hutter R, Speidl WS, Valdiviezo C, Sauter B, Corti R, Fuster V, et al. Macrophages Transmit Potent
813 Proangiogenic Effects of oxLDL In Vitro and In Vivo Involving HIF-1α Activation: a Novel
814 Aspect of Angiogenesis in Atherosclerosis. J Cardiovasc Transl Res. 2013;6:558–69.

815 102. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular
816 endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Mol. Cell. Biol.
817 1996;16:4604–13.

818 103. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2009;29:789–91.

819 104. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. Nat. Rev.
820 Immunol. 2009;9:609–17.

821 105. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NF-kappaB links
822 innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha.
823 Nature. 2008;453:807–11.

824 106. Takaya N, Yuan C, Chu B, Saam T, Polissar NL, Jarvik GP, et al. Presence of intraplaque
825 hemorrhage stimulates progression of carotid atherosclerotic plaques: a high-resolution magnetic
826 resonance imaging study. Circulation. 2005;111:2768–75.

827 107. Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GRY. Necrotic cell death in atherosclerosis. Basic Res.
828 Cardiol. 2011;106:749–60.

829 108. Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. Stroke. 2000;31:774–81.

830 109. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. Cell. 2011;145:341–55.

831 110. Silvestre-Roig C, Winther MP de, Weber C, Daemen MJ, Lutgens E, Soehnlein O. Atherosclerotic
832 Plaque Destabilization Mechanisms, Models, and Therapeutic Strategies. Circ Res.
833 2014;114:214–26.

834 111. Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW. Macrophage expression of active MMP-9 induces
835 acute plaque disruption in apoE-deficient mice. J Clin Invest. 2006;116:59–69.

836 112. Dasu MR, Devaraj S, Jialal I. High glucose induces IL-1beta expression in human monocytes:
837 mechanistic insights. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2007;293:E337-346.

838 113. He F, Li J, Liu Z, Chuang C-C, Yang W, Zuo L. Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in
839 Exercise. Front Physiol. 2016;7:486.

840 114. Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise
841 training status, and dietary intake. Gend Med. 2008;5:218–28.

842 115. Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, et al. Strenuous endurance
843 training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. Eur. J. Appl. Physiol.
844 2001;84:1–6.

845 116. Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, et al. Response of oxidative
846 stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity,
847 in healthy young men and women. Atherosclerosis. 2003;167:327–34.

848 117. Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular
849 exercise. Free Radic. Biol. Med. 2008;44:153–9.

850 118. Gardner AW, Montgomery PS, Casanegra AI, Silva-Palacios F, Ungvari Z, Csiszar A. Association
851 between gait characteristics and endothelial oxidative stress and inflammation in patients with
852 symptomatic peripheral artery disease. Age (Dordr). 2016;38:64.

119. Gardner AW, Montgomery PS, Zhao YD, Silva-Palacios F, Ungvari Z, Csiszar A, et al. Association between daily walking and antioxidant capacity in patients with symptomatic peripheral artery disease. J. Vasc. Surg. 2017;65:1762–8.

120. Toledo-Arruda AC, Vieira RP, Guarnier FA, Suehiro CL, Caleman-Neto A, Olivo CR, et al. Time-course effects of aerobic physical training in the prevention of cigarette smoke-induced COPD. J. Appl. Physiol. 2017;123:674–83.

121. Rowiński R, Kozakiewicz M, Kędziora-Kornatowska K, Hübner-Woźniak E, Kędziora J. Markers of oxidative stress and erythrocyte antioxidant enzyme activity in older men and women with differing physical activity. Exp. Gerontol. 2013;48:1141–6.

122. Fraile-Bermúdez AB, Kortajarena M, Zarrazquin I, Maquibar A, Yanguas JJ, Sánchez-Fernández CE, et al. Relationship between physical activity and markers of oxidative stress in independent community-living elderly individuals. Exp. Gerontol. 2015;70:26–31.

123. Ford ES. Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among U.S. adults. Epidemiology. 2002;13:561–8.

124. Mora S, Lee I-M, Buring JE, Ridker PM. Association of physical activity and body mass index with novel and traditional cardiovascular biomarkers in women. JAMA. 2006;295:1412–9.

125. Yu Z, Ye X, Wang J, Qi Q, Franco OH, Rennie KL, et al. Associations of physical activity with inflammatory factors, adipocytokines, and metabolic syndrome in middle-aged and older chinese people. Circulation. 2009;119:2969–77.

126. Palmefors H, DuttaRoy S, Rundqvist B, Börjesson M. The effect of physical activity or exercise on key biomarkers in atherosclerosis--a systematic review. Atherosclerosis. 2014;235:150–61.

127. Pischon T, Hankinson SE, Hotamisligil GS, Rifai N, Rimm EB. Leisure-time physical activity and reduced plasma levels of obesity-related inflammatory markers. Obes. Res. 2003;11:1055–64.

128. Hamer M, Sabia S, Batty GD, Shipley MJ, Tabák AG, Singh-Manoux A, et al. Physical activity and inflammatory markers over 10 years: follow-up in men and women from the Whitehall II cohort study. Circulation. 2012;126:928–33.

129. Valentine RJ, Vieira VJ, Woods JA, Evans EM. Stronger relationship between central adiposity and C-reactive protein in older women than men. Menopause. 2009;16:84–9.

130. Mattusch F, Dufaux B, Heine O, Mertens I, Rost R. Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training. Int J Sports Med. 2000;21:21–4.

131. LaMonte MJ, Durstine JL, Yanowitz FG, Lim T, DuBose KD, Davis P, et al. Cardiorespiratory fitness and C-reactive protein among a tri-ethnic sample of women. Circulation. 2002;106:403–6.

132. Giallauria F, Palomba S, De Sio I, Maresca L, Vuolo L, Savastano S, et al. Inflammatory markers and visceral fat are inversely associated with maximal oxygen consumption in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). Clin. Endocrinol. (Oxf). 2009;70:394–400.

133. Cesari F, Marcucci R, Gori AM, Burgisser C, Francini S, Sofi F, et al. Impact of a cardiac rehabilitation program and inflammatory state on endothelial progenitor cells in acute coronary syndrome patients. Int. J. Cardiol. 2013;167:1854–9.

891 134. Stein RA, Rockman CB, Guo Y, Adelman MA, Riles T, Hiatt WR, et al. Association Between
892 Physical Activity and Peripheral Artery Disease and Carotid Artery Stenosis in a Self-Referred
893 Population of 3 Million Adults. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015;35:206–12.

894 135. Breneman CB, Polinski K, Sarzynski MA, Lavie CJ, Kokkinos PF, Ahmed A, et al. The Impact of
895 Cardiorespiratory Fitness Levels on the Risk of Developing Atherogenic Dyslipidemia. Am. J.
896 Med. 2016;129:1060–6.

897 136. Pigłowska M, Kostka T, Drygas W, Jegier A, Leszczyńska J, Bill-Bielecka M, et al. Body
898 composition, nutritional status, and endothelial function in physically active men without
899 metabolic syndrome--a 25 year cohort study. Lipids Health Dis. 2016;15:84.

900 137. Crouse SF, O'Brien BC, Grandjean PW, Lowe RC, Rohack JJ, Green JS. Effects of Training and a
901 Single Session of Exercise on Lipids and Apolipoproteins in Hypercholesterolemic Men. J Appl
902 Physiol. 1997;83:2019–28.

903 138. Greene NP, Martin SE, Crouse SF. Acute Exercise and Training Alter Blood Lipid and Lipoprotein
904 Profiles Differently in Overweight and Obese Men and Women. Obesity (Silver Spring, Md.)
905 [Internet]. 2012 [cited 2012 May 22]; Available from:
906 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421926

907 139. Zorba E, Cengiz T, Karacabey K. Exercise training improves body composition, blood lipid profile
908 and serum insulin levels in obese children. J Sports Med Phys Fitness. 2011;51:664–9.

909 140. Herbert PN, Bernier DN, Cullinane EM, Edelstein L, Kantor MA, Thompson PD. High-density
910 lipoprotein metabolism in runners and sedentary men. JAMA. 1984;252:1034–7.

911 141. Brenes G, Dearwater S, Shapera R, LaPorte RE, Collins E. High density lipoprotein cholesterol
912 concentrations in physically active and sedentary spinal cord injured patients. Arch Phys Med
913 Rehabil. 1986;67:445–50.

914 142. Ahn N, Kim K. High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in cardiovascular disease: effect of
915 exercise training. Integr Med Res. 2016;5:212–5.

916 143. Nikkilä EA, Kuusi T, Myllynen P. High density lipoprotein and apolipoprotein A-I during physical
917 inactivity: Demonstration of low levels in patients with spine fracture. Atherosclerosis.
918 1980;37:457–62.

919 144. Slentz CA, Houmard JA, Johnson JL, Bateman LA, Tanner CJ, McCartney JS, et al. Inactivity,
920 exercise training and detraining, and plasma lipoproteins. STRRIDE: a randomized, controlled
921 study of exercise intensity and amount. J. Appl. Physiol. 2007;103:432–42.

922 145. Callegari A, Liu Y, White CC, Chait A, Gough P, Raines EW, et al. Gain and loss of function for
923 glutathione synthesis: impact on advanced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.
924 Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2011;31:2473–82.

925 146. Gieseg SP, Amit Z, Yang Y-T, Shchepetkina A, Katouah H. Oxidant production, oxLDL uptake,
926 and CD36 levels in human monocyte–derived macrophages are downregulated by the
927 macrophage-generated antioxidant 7,8-dihydroneopterin. Antioxid. Redox Signal. 2010;13:1525–
928 34.

929 147. Wang J-S, Lee T, Chow S-E. Role of exercise intensities in oxidized low-density lipoprotein-
930 mediated redox status of monocyte in men. J. Appl. Physiol. 2006;101:740–4.

931 148. Zoppini G, Targher G, Zamboni C, Venturi C, Cacciatori V, Moghetti P, et al. Effects of moderate-
932 intensity exercise training on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in
933 older patients with type 2 diabetes. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2006;16:543–9.

934 149. Gielen S, Sandri M, Erbs S, Adams V. Exercise-induced modulation of endothelial nitric oxide
935 production. Curr Pharm Biotechnol. 2011;12:1375–84.

936 150. Laughlin MH, Newcomer SC, Bender SB. Importance of hemodynamic forces as signals for
937 exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. J. Appl. Physiol. 2008;104:588–600.

938 151. Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, et al. Effect of exercise on coronary
939 endothelial function in patients with coronary artery disease. N. Engl. J. Med. 2000;342:454–60.

940 152. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Kränkel N, Shu Y, et al. Regular physical activity
941 improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing
942 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. Circulation. 2003;107:3152–8.

943 153. Wesnigk J, Bruyndonckx L, Hoymans VY, De Guchtenaere A, Fischer T, Schuler G, et al. Impact of
944 Lifestyle Intervention on HDL-Induced eNOS Activation and Cholesterol Efflux Capacity in
945 Obese Adolescent. Cardiol Res Pract. 2016;2016:2820432.

946 154. Adams V, Linke A, Kränkel N, Erbs S, Gielen S, Möbius-Winkler S, et al. Impact of regular
947 physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with
948 coronary artery disease. Circulation. 2005;111:555–62.

949 155. La Favor JD, Dubis GS, Yan H, White JD, Nelson MAM, Anderson EJ, et al. Microvascular
950 Endothelial Dysfunction in Sedentary, Obese Humans Is Mediated by NADPH Oxidase:
951 Influence of Exercise Training. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2016;36:2412–20.

952 156. Lee S, Park Y, Dellsperger KC, Zhang C. Exercise training improves endothelial function via
953 adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice. Am. J. Physiol. Heart
954 Circ. Physiol. 2011;301:H306-314.

955 157. Ookawara T, Haga S, Ha S, Oh-Ishi S, Toshinai K, Kizaki T, et al. Effects of endurance training on
956 three superoxide dismutase isoenzymes in human plasma. Free Radic. Res. 2003;37:713–9.

957 158. Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, Nerem RM, Harrison DG. Shear stress modulates expression of
958 Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. Circ. Res. 1996;79:32–7.

959 159. Yakeu G, Butcher L, Isa S, Webb R, Roberts AW, Thomas AW, et al. Low-intensity exercise
960 enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: Roles of
961 PPAR[gamma] and Th2 cytokines. Atherosclerosis. 2010;212:668–73.

962 160. Smith JK, Dykes R, Douglas JE, Krishnaswamy G, Berk S. Long-term exercise and atherogenic
963 activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease.
964 JAMA. 1999;281:1722–7.

965 161. Pedersen BK. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease.
966 Eur. J. Clin. Invest. 2017;

967 162. Kizaki T, Takemasa T, Sakurai T, Izawa T, Hanawa T, Kamiya S, et al. Adaptation of macrophages
968 to exercise training improves innate immunity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008;372:152–
969 6.

970 163. Silveira LS, Antunes B de MM, Minari ALA, Dos Santos RVT, Neto JCR, Lira FS. Macrophage
971 Polarization: Implications on Metabolic Diseases and the Role of Exercise. Crit. Rev. Eukaryot.
972 Gene Expr. 2016;26:115–32.

973 164. Lesniewski LA, Durrant JR, Connell ML, Henson GD, Black AD, Donato AJ, et al. Aerobic
974 exercise reverses arterial inflammation with aging in mice. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.
975 2011;301:H1025-1032.

976 165. Nishiguchi T, Tanaka A, Taruya A, Emori H, Ozaki Y, Orii M, et al. Local Matrix
977 Metalloproteinase 9 Level Determines Early Clinical Presentation of ST-Segment-Elevation
978 Myocardial Infarction. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2016;36:2460–7.

979 166. Hopps E, Caimi G. Matrix metalloproteases as a pharmacological target in cardiovascular diseases.
980 Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2015;19:2583–9.

981 167. Chan CP, Jiang H, Leung L, Wan W, Cheng N, Ip W, et al. Multiple atherosclerosis-related
982 biomarkers associated with short- and long-term mortality after stroke. Clin. Biochem.
983 2012;45:1308–15.

984 168. Nascimento D da C, Durigan R de CM, Tibana RA, Durigan JLQ, Navalta JW, Prestes J. The
985 response of matrix metalloproteinase-9 and -2 to exercise. Sports Med. 2015;45:269–78.

986 169. Moustardas P, Kadoglou NPE, Katsimpoulas M, Kapelouzou A, Kostomitsopoulos N,
987 Karayannacos PE, et al. The complementary effects of atorvastatin and exercise treatment on the
988 composition and stability of the atherosclerotic plaques in ApoE knockout mice. PLoS ONE.
989 2014;9:e108240.

990 170. Soumyarani VS, Jayakumari N. Oxidatively modified high density lipoprotein promotes
991 inflammatory response in human monocytes-macrophages by enhanced production of ROS, TNF-
992 α, MMP-9, and MMP-2. Mol. Cell. Biochem. 2012;366:277–85.

993 171. McCarthy SM, Bove PF, Matthews DE, Akaike T, van der Vliet A. Nitric Oxide Regulation of
994 MMP-9 Activation and Its Relationship to Modifications of the Cysteine Switch†. Biochemistry.
995 2008;47:5832–40.

996 172. Kadoglou NPE, Kostomitsopoulos N, Kapelouzou A, Moustardas P, Katsimpoulas M, Giagini A, et
997 al. Effects of exercise training on the severity and composition of atherosclerotic plaque in apoE-
998 deficient mice. J. Vasc. Res. 2011;48:347–56.

999 173. Shon S-M, Park J-H, Nahrendorf M, Schellingerhout D, Kim J-Y, Kang B-T, et al. Exercise
1000 attenuates matrix metalloproteinase activity in preexisting atherosclerotic plaque. Atherosclerosis.
1001 2011;216:67–73.

1002 174. Krause M, Rodrigues-Krause J, O'Hagan C, Medlow P, Davison G, Susta D, et al. The effects of
1003 aerobic exercise training at two different intensities in obesity and type 2 diabetes: implications
1004 for oxidative stress, low-grade inflammation and nitric oxide production. Eur. J. Appl. Physiol.
1005 2014;114:251–60.

1006 175. Yang A-L, Chen H-I. Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially
1007 reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. Atherosclerosis.
1008 2003;169:11–7.

1009 176. Kargarfard M, Lam ETC, Shariat A, Asle Mohammadi M, Afrasiabi S, Shaw I, et al. Effects of
1010 endurance and high intensity training on ICAM-1 and VCAM-1 levels and arterial pressure in
1011 obese and normal weight adolescents. Phys Sportsmed. 2016;44:208–16.

1012 177. Mills PJ, Hong S, Redwine L, Carter SM, Chiu A, Ziegler MG, et al. Physical fitness attenuates
1013 leukocyte-endothelial adhesion in response to acute exercise. J. Appl. Physiol. 2006;101:785–8.

1014 178. Swardfager W, Herrmann N, Cornish S, Mazereeuw G, Marzolini S, Sham L, et al. Exercise
1015 intervention and inflammatory markers in coronary artery disease: a meta-analysis. Am. Heart J.
1016 2012;163:666-676.e1-3.

1017 179. Ibrahim H, Kleiman NS. Platelet pathophysiology, pharmacology, and function in coronary artery
1018 disease. Coron. Artery Dis. 2017;

1019 180. Wang J, Jen CJ, Chen H. Effects of Exercise Training and Deconditioning on Platelet Function in
1020 Men. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 1995;15:1668–74.

1021 181. Rauramaa R, Salonen JT, Seppänen K, Salonen R, Venäläinen JM, Ihanainen M, et al. Inhibition of
1022 platelet aggregability by moderate-intensity physical exercise: a randomized clinical trial in
1023 overweight men. Circulation. 1986;74:939–44.

1024 182. Surya II, Gorter G, Mommersteeg M, Akkerman JW. Enhancement of platelet functions by low
1025 density lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta. 1992;1165:19–26.

1026 183. Chiu J-J, Lee P-L, Chen C-N, Lee C-I, Chang S-F, Chen L-J, et al. Shear stress increases ICAM-1
1027 and decreases VCAM-1 and E-selectin expressions induced by tumor necrosis factor-[alpha] in
1028 endothelial cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2004;24:73–9.

1029 184. Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, et al. Endothelin-1 Increases
1030 Vascular Superoxide Via EndothelinA–NADPH Oxidase Pathway in Low-Renin Hypertension.
1031 Circulation. 2003;107:1053–8.

1032 185. Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. Hellenic J
1033 Cardiol. 2009;50:402–9.

1034 186. Weber C, Erl W, Pietsch A, Strobel M, Ziegler-Heitbrock H, Weber P. Antioxidants inhibit
1035 monocyte adhesion by suppressing nuclear factor- kappa B mobilization and induction of
1036 vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals.
1037 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 1994;14:1665–73.

1038 187. Thompson PD, Buchner D, Piña IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, et al. Exercise and
1039 Physical Activity in the Prevention and Treatment of Atherosclerotic Cardiovascular Disease A
1040 Statement From the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation,
1041 and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee
1042 on Physical Activity). Circulation. 2003;107:3109–16.

1043 188. Schnohr P, O'Keefe JH, Lange P, Jensen GB, Marott JL. Impact of persistence and non-persistence
1044 in leisure time physical activity on coronary heart disease and all-cause mortality: The
1045 Copenhagen City Heart Study. Eur J Prev Cardiol. 2017;2047487317721021.

1046 189. Berlin JA, Colditz GA. A Meta-Analysis of Physical Activity in the Prevention of Coronary Heart
1047 Disease. Am. J. Epidemiol. 1990;132:612–28.

1048 190. Rauramaa R, Rankinen T, Tuomainen P, Väisänen S, Mercuri M. Inverse relationship between
1049 cardiorespiratory fitness and carotid atherosclerosis. Atherosclerosis. 1995;112:213–21.

1050 191. Sofi F, Capalbo A, Cesari F, Abbate R, Gensini GF. Physical activity during leisure time and
1051 primary prevention of coronary heart disease: an updated meta-analysis of cohort studies.
1052 European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation. 2008;15:247–57.

1053 192. K E Powell, P D Thompson, C J Caspersen, Kendrick and JS. Physical Activity and the Incidence
1054 of Coronary Heart Disease. Annual Review of Public Health. 1987;8:253–87.

1055 193. Stamatakis E, Hamer M, Lawlor DA. Physical activity, mortality, and cardiovascular disease: is
1056 domestic physical activity beneficial? The Scottish Health Survey -- 1995, 1998, and 2003. Am.
1057 J. Epidemiol. 2009;169:1191–200.

1058 194. Bowles DK, Laughlin MH. Mechanism of beneficial effects of physical activity on atherosclerosis
1059 and coronary heart disease. J Appl Physiol (1985). 2011;111:308–10.

1060 195. Rush JWE, Denniss SG, Graham DA. Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of
1061 endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. Can J Appl Physiol.
1062 2005;30:442–74.

1063 196. Pialoux V, Mounier R, Brown AD, Steinback CD, Rawling JM, Poulin MJ. Relationship between
1064 oxidative stress and HIF-1 alpha mRNA during sustained hypoxia in humans. Free Radic. Biol.
1065 Med. 2009;46:321–6.

1066 197. Szostak J, Laurant P. The forgotten face of regular physical exercise: a “natural” anti-atherogenic
1067 activity. Clin. Sci. 2011;121:91–106.

1068 198. Delaney CL, Spark JI. A randomised controlled trial of two supervised exercise regimens and their
1069 impact on inflammatory burden in patients with intermittent claudication. Vascular.
1070 2016;24:264–72.

1071 199. Agrotou S, Karatzi K, Papamichael C, Fatouros I, Mitrakou A, Zakopoulos N, et al. Effects of
1072 chronic anaerobic training on markers of sub-clinical atherosclerosis. Hellenic J Cardiol.
1073 2013;54:178–85.

1074 200. Taylor BA, Zaleski AL, Capizzi JA, Ballard KD, Troyanos C, Baggish AL, et al. Influence of
1075 chronic exercise on carotid atherosclerosis in marathon runners. BMJ Open. 2014;4:e004498.

1076 201. Prince SA, Blanchard CM, Grace SL, Reid RD. Objectively-measured sedentary time and its
1077 association with markers of cardiometabolic health and fitness among cardiac rehabilitation
1078 graduates. European Journal of Preventive Cardiology. 2016;23:818–25.

1079 202. Hambrecht R, Walther C, Möbius-Winkler S, Gielen S, Linke A, Conradi K, et al. Percutaneous
1080 coronary angioplasty compared with exercise training in patients with stable coronary artery
1081 disease: a randomized trial. Circulation. 2004;109:1371–8.

1082 203. Forbes C, Quek RGW, Deshpande S, Worthy G, Ross J, Kleijnen J, et al. Relationship between
1083 changes in coronary atherosclerotic plaque burden measured by intravascular ultrasound and
1084 cardiovascular disease outcomes: a systematic literature review. Current Medical Research and
1085 Opinion. 2016;32:1143–50.

1086 204. Nishitani-Yokoyama M, Miyauchi K, Shimada K, Miyazaki T, Ogita M, Okazaki S, et al. Effects of
1087 Phase II Comprehensive Cardiac Rehabilitation on Coronary Plaque Volume After Acute
1088 Coronary Syndrome. Int Heart J. 2015;56:597–604.

1089 205. Lakka TA, Laukkanen JA, Rauramaa R, Salonen R, Lakka HM, Kaplan GA, et al. Cardiorespiratory
1090 fitness and the progression of carotid atherosclerosis in middle-aged men. Ann. Intern. Med.
1091 2001;134:12–20.

1092 206. Desai MY, Nasir K, Rumberger JA, Braunstein JB, Post WS, Budoff MJ, et al. Relation of degree of
1093 physical activity to coronary artery calcium score in asymptomatic individuals with multiple
1094 metabolic risk factors. The American Journal of Cardiology. 2004;94:729–32.

1095 207. Jae SY, Franklin BA, Schmidt-Trucksass A, Kim DK, Choi Y-H, Park JB. Relation of
1096 Cardiorespiratory Fitness to Risk of Subclinical Atherosclerosis in Men With Cardiometabolic
1097 Syndrome. Am. J. Cardiol. 2016;118:1282–6.

1098 208. Kwaśniewska M, Jegier A, Kostka T, Dziankowska-Zaborszczyk E, Rębowska E, Kozińska J, et al.
1099 Long-Term Effect of Different Physical Activity Levels on Subclinical Atherosclerosis in
1100 Middle-Aged Men: A 25-Year Prospective Study. PLoS One [Internet]. 2014 [cited 2016 Apr
1101 15];9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3896363/

1102 209. Wilund KR, Tomayko EJ, Evans EM, Kim K, Ishaque MR, Fernhall B. Physical activity, coronary
1103 artery calcium, and bone mineral density in elderly men and women: a preliminary investigation.
1104 Metabolism. 2008;57:584–91.

1105 210. Bots ML, Baldassarre D, Simon A, de Groot E, O'Leary DH, Riley W, et al. Carotid intima-media
1106 thickness and coronary atherosclerosis: weak or strong relations? Eur. Heart J. 2007;28:398–406.

1107 211. Tanaka H, Seals DR, Monahan KD, Clevenger CM, DeSouza CA, Dinenno FA. Regular aerobic
1108 exercise and the age-related increase in carotid artery intima-media thickness in healthy men. J.
1109 Appl. Physiol. 2002;92:1458–64.

1110 212. Rauramaa R, Halonen P, Väisänen SB, Lakka TA, Schmidt-Trucksäss A, Berg A, et al. Effects of
1111 aerobic physical exercise on inflammation and atherosclerosis in men: the DNASCO Study: a six-
1112 year randomized, controlled trial. Ann. Intern. Med. 2004;140:1007–14.

1113 213. Anderssen SA, Hjelstuen AK, Hjermann I, Bjerkan K, Holme I. Fluvastatin and lifestyle
1114 modification for reduction of carotid intima-media thickness and left ventricular mass progression
1115 in drug-treated hypertensives. Atherosclerosis. 2005;178:387–97.

1116 214. Chan SY, Mancini GBJ, Burns S, Johnson FF, Brozic AP, Kingsbury K, et al. Dietary measures and
1117 exercise training contribute to improvement of endothelial function and atherosclerosis even in
1118 patients given intensive pharmacologic therapy. J Cardiopulm Rehabil. 2006;26:288–93.

1119 215. Gori N, Anania G, Stefani L, Boddi M, Galanti G. Carotid Intima-Media Thickness in Master
1120 Athletes. Asian Journal of Sports Medicine [Internet]. 2015 [cited 2016 Jul 5];6. Available from:
1121 http://asjsm.com/?page=article&article_id=22587

1122 216. Schmidt-Trucksäss AS, Grathwohl D, Frey I, Schmid A, Boragk R, Upmeier C, et al. Relation of
1123 leisure-time physical activity to structural and functional arterial properties of the common
1124 carotid artery in male subjects. Atherosclerosis. 1999;145:107–14.

1125 217. Ebrahim S, Papacosta O, Whincup P, Wannamethee G, Walker M, Nicolaides AN, et al. Carotid
1126 plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors, and prevalent cardiovascular disease
1127 in men and women: the British Regional Heart Study. Stroke. 1999;30:841–50.

1128 218. Ferreira I, Twisk JWR, Stehouwer CDA, van Mechelen W, Kemper HCG. Longitudinal changes in
1129 .VO2max: associations with carotid IMT and arterial stiffness. Med Sci Sports Exerc.
1130 2003;35:1670–8.

1131 219. Pahkala K, Laitinen TT, Heinonen OJ, Viikari JSA, Rönnemaa T, Niinikoski H, et al. Association of
1132 fitness with vascular intima-media thickness and elasticity in adolescence. Pediatrics.
1133 2013;132:e77-84.

1134 220. Kim ES, Park J-H, Lee MK, Lee DH, Kang ES, Lee HC, et al. Associations between Fatness,
1135 Fitness, IGF and IMT among Obese Korean Male Adolescents. Diabetes Metab J. 2011;35:610–
1136 8.

1137 221. Silva LR, Cavaglieri C, Lopes WA, Pizzi J, Coelho-e-Silva MJC, Leite N. Endothelial wall
1138 thickness, cardiorespiratory fitness and inflammatory markers in obese and non-obese
1139 adolescents. Braz J Phys Ther. 2014;18:47–55.

1140 222. Tanaka H, DeSouza CA, Seals DR. Absence of Age-Related Increase in Central Arterial Stiffness in
1141 Physically Active Women. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998;18:127–32.

1142 223. Ried-Larsen M, Grøntved A, Froberg K, Ekelund U, Andersen LB. Physical activity intensity and
1143 subclinical atherosclerosis in Danish adolescents: The European Youth Heart Study. Scand J Med
1144 Sci Sports. 2013;23:e168–77.

1145 224. Pälve KS, Pahkala K, Magnussen CG, Koivistoinen T, Juonala M, Kähönen M, et al. Association of
1146 physical activity in childhood and early adulthood with carotid artery elasticity 21 years later: the
1147 cardiovascular risk in Young Finns Study. J Am Heart Assoc. 2014;3:e000594.

1148 225. Horta BL, Schaan BD, Bielemann RM, Vianna CÁ, Gigante DP, Barros FC, et al. Objectively
1149 measured physical activity and sedentary-time are associated with arterial stiffness in Brazilian
1150 young adults. Atherosclerosis. 2015;243:148–54.

1151 226. Luedemann J, Schminke U, Berger K, Piek M, Willich SN, Döring A, et al. Association between
1152 behavior-dependent cardiovascular risk factors and asymptomatic carotid atherosclerosis in a
1153 general population. Stroke. 2002;33:2929–35.

1154 227. Skrypnik D, Bogdański P, Madry E, Pupek-Musialik D, Walkowiak J. [Effect of physical exercise
1155 on endothelial function, indicators of inflammation and oxidative stress]. Pol. Merkur. Lekarski.
1156 2014;36:117–21.

1157 228. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of
1158 Endothelial Nitric Oxide Synthase in Response to Fluid Shear Stress. Circ Res. 1996;79:984–91.

1159 229. Sandrock M, Schulze C, Schmitz D, Dickhuth H-H, Schmidt-Trucksaess A. Physical activity
1160 throughout life reduces the atherosclerotic wall process in the carotid artery. Br J Sports Med.
1161 2008;42:839–44.

1162

1163

Table 1. Main attributes of stable and vulnerable plaques in coronary and carotids

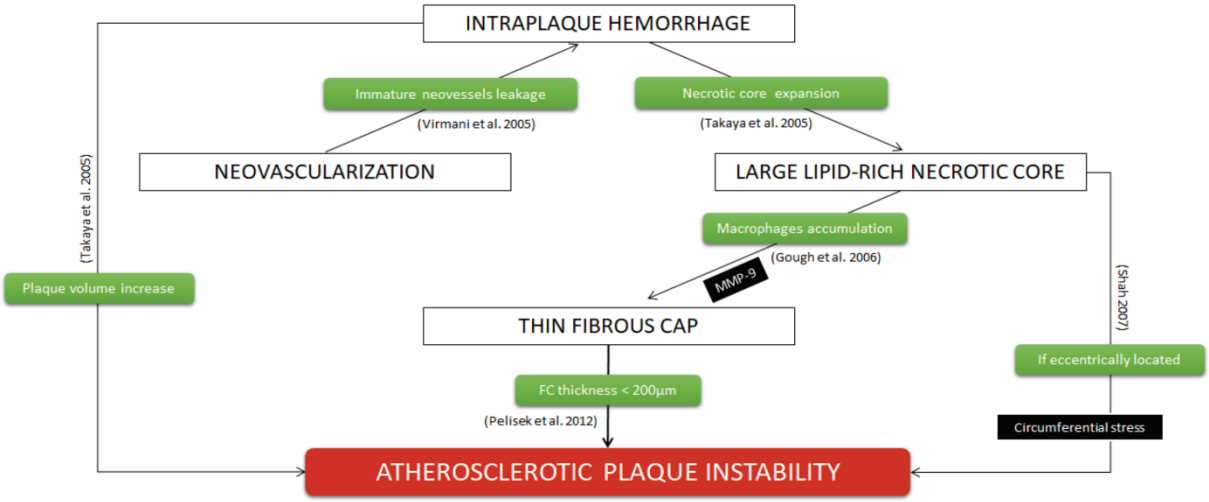
Attributes	Coronary atherosclerosis	Carotid atherosclerosis
Thin fibrous cap	Plaque instability component	Plaque instability component
Large lipid-rich necrotic core	Plaque instability component	Plaque instability component
Intraplaque hemorrhage	Plaque instability component	Plaque instability component
Neovascularization	Plaque instability component	Plaque instability component
Stenosis percent	Non-predictive factor	Predictive factor
Plaque disruption mechanism	Plaque rupture (60%) and plaque erosion (35%)	Mostly plaque rupture
Ischemic event cause	Mostly luminal thrombosis	Mostly embolism
Mechanical forces involved	Low shear forces	Important shear forces

Figure legends

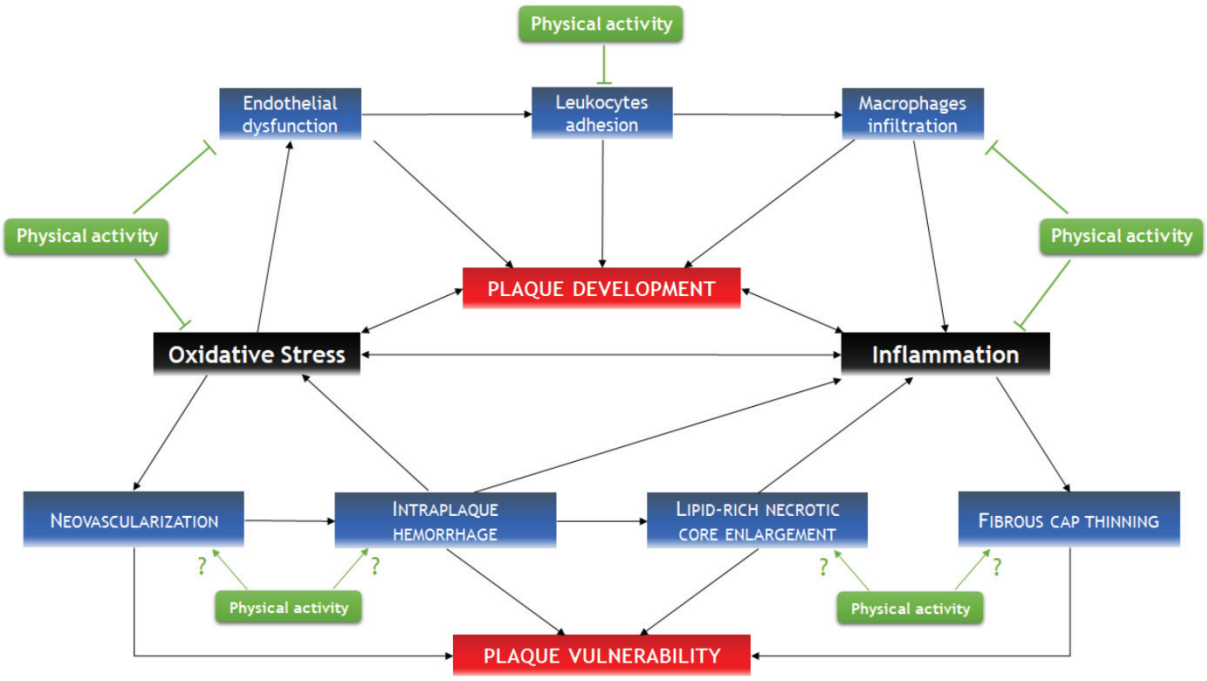
Figure 1. *Main mechanisms of atherosclerotic plaque instability according to morphology attributes.* The figure displays the main anatomical factors involved in atherosclerotic plaque instability. Intraplaque hemorrhage (IPH) has been shown to represent the major determining factor of plaque instability. IPH is promoted by neovascularization, which is due to irregular neovessels from the adventitia vasa vasorum invading the intima. This compensation could be due to the vascular wall being in a hypoxic state. IPH can cause an accumulation of erythrocytes in the lipid-rich necrotic core which increases its volume and plaque instability. Accumulated erythrocytes can release hemoglobin and iron and provoke cholesterol efflux [90]. The lipid-rich necrotic core is composed of free cholesterol, cholesterol crystals, and cholesterol esters derived from lipids [85]. Its development depends on apoptosis or necrosis of macrophages (in particular, foam cells) and T cells [86]. Finally, plaque instability is due to the thinning of the fibrous cap. An optimal width of 200µm of fibrous cap is proposed as the minimum thickness associated with a ruptured plaque (Pelisek et al. 2012).

Figure 2. *Effects of regular physical activity on parameters involved in atherosclerosis pathophysiology.* This figure displays the main factors involved in atherosclerotic plaque development and vulnerability. Oxidative stress and inflammation have been shown to induce atherogenesis directly and indirectly by the way of endothelial dysfunction, leukocytes adhesion and macrophage infiltration. Similarly, these two parameters are known to enhance neovascularization and fibrous cap thinning leading to intraplaque hemorrhage and lipid-rich necrotic core enlargement, which increase plaque vulnerability. Physical activity was shown to limit oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction, leukocytes adhesion and macrophages infiltration, leading to a decreased risk of atherogenesis. Effects of regular physical activity on neovascularization, intraplaque hemorrhage, lipid-rich necrotic core enlargement and fibrous cap thinning need to be elucidated by further studies.

Figure 1.


INTRAPLAQUE HEMORRHAGE
Immature neovessels leakage
(Virmani et al. 2005)
Necrotic core expansion
(Takaya et al. 2005)
NEOVASCULARIZATION
LARGE LIPID-RICH NECROTIC CORE
(Takaya et al. 2005)
Plaque volume increase
Macrophages accumulation
(Gough et al. 2006)
MMP-9
THIN FIBROUS CAP
(Shah 2007)
If eccentrically located
FC thickness < 200µm
(Pelisek et al. 2012)
Circumferential stress
ATHEROSCLEROTIC PLAQUE INSTABILITY

1231 Figure 2.



1232

Résumé : L'athérosclérose est une maladie cardiovasculaire complexe affectant la paroi artérielle où le développement et la progression de la plaque sont fortement favorisés par une inflammation chronique. L'instabilité de la plaque carotidienne peut conduire à de potentiels évènements ischémiques majeurs tels que l'accident vasculaire cérébral (AVC) dont le caractère imprévisible rend la prévention primaire très compliquée. Ainsi, il n'existe pas à l'heure actuelle de biomarqueurs prédictifs efficaces de la rupture de plaque. Néanmoins, il est maintenant clairement établi que l'hémorragie intraplaque (IPH), la néovascularisation et l'accumulation excessive de macrophages sont les principaux facteurs d'instabilité de la plaque. Sur la base de travaux précédents, l'objectif de cette thèse était d'évaluer de manière indépendante les effets de l'activité physique (AP) et de la sédentarité, premièrement sur les paramètres histologiques d'instabilité de plaque, et deuxièmement, sur les facteurs de risque secondaires de l'athérosclérose, que sont l'inflammation, le stress oxydant et le profil hémorhéologique de patients asymptomatiques à risque d'AVC traités chirurgicalement. La 1ère étude a montré que l'AP régulière était associée à une prévalence d'IPH diminuée, et était l'unique facteur protecteur de l'IPH. Cette étude a également suggéré un effet bénéfique de l'AP sur le stress oxydant, ainsi que sur l'accumulation de macrophages. Dans une 2ème étude, nous avons caractérisé l'état fonctionnel de protéines potentiellement impliquées dans les dysfonctions du système immunitaire, et l'implication des cellules inflammatoires dans ces mécanismes. Nous avons alors identifié une cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle déterminant dans les processus inflammatoires de déstabilisation de plaque. L'étude 3 nous a permis de caractériser l'effet du niveau d'AP sur la réponse monocytaire chez des patients avec plaque d'athérosclérose, et d'identifier une chimiokine qui pourrait avoir un rôle dans la modulation de la réponse monocytaire par l'AP. Enfin, la 4ème étude démontre l'altération de paramètres hémorhéologiques chez des patients atteints de maladie carotidienne sévère, et comment l'AP permet de limiter cette altération via la diminution de l'agrégation érythrocytaire. Ce travail de thèse apporte des informations quant à la pratique de l'AP dans la prévention primaire de l'athérosclérose. Des études complémentaires seront toutefois nécessaires afin de confirmer ces résultats, en proposant notamment une approche interventionnelle en activité physique.

Mots clés : Athérosclérose, Hémorragie intraplaque, Inflammation, Activité physique, Sédentarité, Stress oxydant, Agrégation érythrocytaire.

Mechanisms and impact of physical activity and sedentary behavior on biological risk factors of carotid atherosclerotic plaque instability

Abstract: Atherosclerosis is a complex cardiovascular disease that affects the arterial wall where plaque development and progression are severely promoted by chronic inflammation. Carotid plaque destabilization could lead to potential major ischemic events such stroke which is still unpredictable, making primary prevention very complex. Thus, there is still currently no suitable predictive biomarker of plaque rupture. Nevertheless, it is now clearly established that intraplaque hemorrhage (IPH), neovascularization and excessive macrophage accumulation are the three main risk factors of plaque instability. Based on previous studies, the aim of this work was to evaluate independently the impact of physical activity (PA) and sedentary behavior, first on histological parameters of plaque instability, and secondly on secondary risk factors of atherosclerosis, such as inflammation, oxidative stress and hemorheological profile of asymptomatic patients at high-risk of stroke who underwent endarterectomy surgery. The first study shows that regular PA was associated to a decreased occurrence of IPH and was the only protective factor for IPH. This study also suggested a beneficial effect of PA on macrophage accumulation as well as on oxidative stress. Then, in the 2nd study, we have characterized the functional state of proteins potentially implicated in immune system dysfunctions, and the implication of inflammatory cells in these mechanisms. We have identified a pro-inflammatory cytokine as a key driver of disrupting inflammatory process of plaque. In the same way, we have characterized in the 3rd study, the effect of PA on the monocytic response in atherosclerosis patients, and identified a chemokine associated that could explain the modulation of this monocytic response by PA. Finally, the 4th study demonstrates the hemorheological parameters alteration in carotid artery disease patients, and how PA could limit this alteration via red blood cell aggregation. This PhD thesis provided information regarding regular PA in primary prevention of atherosclerosis. However, additional studies are required to confirm these results, using in particular PA interventional approach.

Key words: Atherosclerosis, Intraplaque hemorrhage, Inflammation, Oxidative stress, Physical activity, Sedentary behavior, Red blood cell aggregation.