

UBO

université de bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie-Santé

École Doctorale SICMA

Présentée par

Florine Tissier

Préparée au sein du laboratoire

Optimisation des Régulations

Physiologiques (EA 4324 ORPHY)

Effets à long terme de l'atorvastatine à faible dose sur l'athérosclérose : une étude pluridisciplinaire chez un modèle animal, le lapin Watanabe.



Thèse soutenue le 3 décembre 2015

devant le jury composé de :

Patrice Guérin

PU-PH, CHRU Nantes / *Rapporteur*

Olivier Morel

PU-PH, CHRU Strasbourg / *Rapporteur*

Yassine Mallem

Maître de Conférences, UPSP 5304, ONIRIS, Nantes / *Examineur*

Jacques Mansourati

PU-PH, UBO, CHRU Cavale blanche / *Examineur*

Martine Gilard

PU-PH, UBO, CHRU Cavale blanche / *Directrice de thèse*

Karine Pichavant-Rafini

Maître de Conférences, UBO / *Co-directrice de thèse/ membre invité*

Michael Theron

Maître de Conférences, UBO / *Co-encadrant / Membre invité*

Remerciements

Parce que la recherche est un travail d'équipe, et que pour un doctorant qui soutient sa thèse il y a toujours de nombreuses personnes à avoir apporté leur pierre à l'édifice, je souhaite remercier ceux qui par leur travail, leur soutien ou tout simplement leur présence, ont rendu possible le déroulement et la finalisation de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier les professeurs Patrice Guérin et Olivier Morel d'avoir accepté d'être rapporteur et de faire partie du jury de cette thèse. Merci au professeur Jacques Mansourati et au Docteur Yassine Mallem d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je tiens également à remercier notre directrice de laboratoire, Madame Christine Moisan, d'avoir soutenu ce projet et encouragé le travail collaboratif.

Je tiens bien évidemment à remercier ma directrice de thèse, le Professeur Martine Gilard, pour avoir rendu possible ce projet, pour ses connaissances et son dynamisme qui ont permis ce travail entre recherche fondamentale et problématique clinique.

Un grand merci à ma co-directrice, Mme Karine Pichavant-Rafini d'avoir cru en moi, de m'avoir donné l'envie de poursuivre en doctorat, et de m'avoir supporté et soutenu dans mon travail tout au long de ces années ensemble.

Merci à Michael Théron, d'avoir embarqué dans l'aventure et participé grandement aux expérimentations et à l'encadrement de cette thèse.

Merci à Romain d'avoir fait parti du projet.

Je remercie également la région Bretagne pour mon financement, l'UBO et ses plateformes techniques ainsi que l'école doctorale SICMA.

Merci à mes étudiants et stagiaires d'avoir été si indulgents et de m'avoir permis de faire mes premières heures d'enseignement et d'encadrement dans les meilleures conditions qu'il soit possible d'avoir.

Merci aux habitants du bureau des doctorants, passés et présents, notamment Julie, Karima, Firas et Jacky, pour leur bonne humeur, leur écoute et les recherches annexes sur la guimauve.

Merci à tous ceux qui ont fait les « nuits du lapin » : Christelle, Firas, Aline, Karine, Michaël, Jacky, Martine, Romain, super Françoise, Elisabeth, Sébastien et les stagiaires (Fabien, Melissa, Clothilde, Thibaut).

Merci à l'ensemble du laboratoire pour les bons moments, les cogitations en salle café et les encouragements.

Merci à tous ceux qui, dans leurs laboratoires respectifs, se sont impliqués dans les « manip lapin » avec optimisme, curiosité et bonne humeur (même si malheureusement tout n'a pas pu être intégré ici) :

- A l'école vétérinaire (Oniris) : Jean-Claude Desfontis, Yassine Mallem, Nathalie Bourgeois et Carole Lenne.
- En radiologie (CHRU) : Douraied Ben Salem, Elisabeth Bruyant, Sébastien Kerdraon
- En hémodynamique (CHRU) : Françoise Martin, Jacques Boschat
- En biochimie (CHRU) : Emmanuelle Plee-Gautier
- En Rhéologie (LIMAT B) : Thierry Aubry et Philippe Roquefort.
- En physique (LSOL) : Yann Legrand et Matthieu Dubreuil.
- En informatique (Lab-STICC, CERV) : Vincent Rodin et Gireg Desmeulles
- En spectrométrie de flux (Immuno EA2216) : Anne Bordron

Merci à Michel pour ses relectures attentives et bienveillantes.

Merci à Stella pour son aide jusqu'à son départ en retraite, son enseignement des bonnes pratiques de laboratoire et son dynamisme communicatif.

Merci aussi à Sabine !

Evidemment aux amis : merci au groupe du mardi soir (plus ou moins étendu) : Nadège, Anne-Sophie, Estelle, Jasmine, Jonathan, Alexandre, Yannick, Erwan. Mais aussi Sabrina, Lucie, Adrian, Valérie, Renée-France, Barbara, Mylène, Josy, Stéphanie, Jean-Pierre et Thierry.

Bien sûr, ces remerciements seraient dénués de sens sans un grand merci à ma mère et ma grand-mère pour leur amour sans limite, leur soutien et leur implication dans tout ce que j'entreprends, leur compréhension et leur patience dans les moments durs. Elles peuvent être fières d'elles aujourd'hui.

Enfin, merci à mon affreux, pour son amour, sa folie, et les grains de bonheur qu'il sème dans ma vie.

Liste des abréviations et des acronymes	1
INTRODUCTION GENERALE	4
1. Maladies cardiovasculaires	5
2. Structure des vaisseaux	8
3. Athérosclérose	10
3.1 Définition	10
3.2 Développement de la pathologie	11
3.2.1 Initialisation et strie lipidique.....	14
3.2.2 Mise en place du noyau lipidique.....	16
3.2.3 Plaque instable et risque de rupture.....	18
4. Athérosclérose : détection et quantification	20
5. Athérosclérose et moyens thérapeutiques	23
6. Objectifs de la thèse	29
CHAPITRE 1 : Evolution de l'athérosclérose : Suivi par OCT	38
1. INTRODUCTION.....	39
ARTICLE 1	47
2. DISCUSSION	58
CHAPITRE 2 : Effets du traitement par atorvastatine sur le système vasculaire	61
1. INTRODUCTION.....	62
ARTICLE 2	76
2. DISCUSSION	90

CHAPITRE 3 : Suivi des paramètres de l'inflammation et de l'adhésion	94
1. INTRODUCTION.....	95
Article 3.....	112
2. DISCUSSION	123
CHAPITRE 4 : Capacités oxydatives et susceptibilité aux ROS du myocarde	128
1. INTRODUCTION.....	129
Article 4.....	139
2. DISCUSSION	154
CONCLUSIONS GENERALES.....	159
BIBLIOGRAPHIE	166
VALORISATION SCIENTIFIQUE	194

Liste des abréviations et des acronymes

ALAT : alanine aminotransferase
AGE : advanced-glycosylation end products
AVC : accident vasculaire cérébral
ASAT : aspartate aminotransférase
CAT : catalase
CML : cellule musculaire lisse
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CRP : protéine C réactive
e-NOS : NO synthase endothéliale
GPx : glutathion peroxydase
GR : glutathion reductase
HDL : lipoprotéines de haute densité (high density lipoprotein)
HMG CoA réductase : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Co enzyme A reductase
ICAM-1 : intercellular adhesion molecule
IL : interleukine
INF γ : interféron gamma
IRM : imagerie par résonance magnétique
IVUS : intravascular ultrasound
LEE : limitante élastique externe
LEI : limitante élastique interne
LDL : lipoprotéines de basse densité (low density lipoprotein)
LDLox : lipoprotéines de basse densité oxydées
MCP-1 : matrix chimioattractant protéine-1
MCV : maladies cardi-vasculaires
MDA : malondialdéhyde
MEC : matrice extracellulaire
MMPs : métalloprotéases matricielles
NCEP : national cholesterol education program
NK : natural killer
NO : monoxyde d'azote (nitric oxide)
NOS : NO synthase
OCT : tomographie par cohérence optique (optical coherence tomography)
OMS : organisation mondiale de la santé
ROS : espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)
SOD : superoxyde dismutase
TF : Facteur tissulaire (tissue factor)
TGF β : tumor growth factor β
TNF α : tumor necrosis factor alpha
UCP : uncoupling protein

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1

VOP : vitesse de l'onde de pouls

WHHL : Watanabe heritable hyperlipidemic

INTRODUCTION GENERALE

1. Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont définies par l’OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Elles comprennent :

- les cardiopathies coronariennes (touchant les vaisseaux sanguins qui alimentent le muscle cardiaque),
- les maladies cérébro-vasculaires (touchant les vaisseaux sanguins qui alimentent le cerveau),
- les artériopathies périphériques (touchant les vaisseaux sanguins qui alimentent les bras et les jambes),
- les cardiopathies rhumatismales, affectant le muscle et les valves cardiaques et résultant d’un rhumatisme articulaire aigu, causé par une bactérie streptocoque,
- les malformations cardiaques congénitales (malformations de la structure du cœur déjà présentes à la naissance),
- les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires (obstruction des veines des jambes par un caillot sanguin, susceptible de se libérer et de migrer vers le cœur ou les poumons).

Première cause de mortalité dans le monde, les MCV sont responsables de 17.5 millions de décès en 2012 (31% des décès) dont 7.4 millions liés aux cardiopathies coronariennes et 6.7 aux accidents vasculaires cérébraux (AVC) [OMS, 2015]. L’infarctus du myocarde et l’AVC sont ainsi les deux principales pathologies associées à la mortalité imputable aux MCV (Tableau 1).

Disorder	Ranking		Change in ranking
	1990	2020 (baseline model)	
Within top 15			
Ischaemic heart disease	1	1	0
Cerebrovascular disease	2	2	0
Lower respiratory infections	3	4	↓1
Diarrhoeal diseases	4	11	↓7
Perinatal disorders	5	16	↓11
Chronic obstructive pulmonary disease	6	3	↑3
Tuberculosis	7	7	0
Measles	8	27	↓19
Road-traffic accidents	9	6	↑3
Trachea, bronchus, and lung cancers	10	5	↓5
Malaria	11	29	↓18
Self-inflicted injuries	12	10	↑2
Cirrhosis of the liver	13	12	↑1
Stomach cancer	14	8	↑6
Diabetes mellitus	15	19	↓4

Tableau 1 : Classement des principales causes de décès dans le monde (Murray & Lopez, 1997).

L'Afrique, l'Inde et l'Asie, jusqu'à présent peu touchées par ces pathologies, voient une augmentation de leur incidence en raison de l'évolution des modes de vie de ces populations, de plus en plus proches de celui des sociétés occidentales [Ranjith *et al.*, 2005]. De même, on observe en Europe un gradient Nord-Sud (Figure 1) lié aux habitudes de vie [Tunstall-Pedoe *et al.*, 1994]. Pour autant, la présence de pathologies cardiovasculaires n'est pas un mal moderne lié uniquement aux modes de vie. Des lésions artérielles ont en effet pu être observées dès l'Égypte ancienne à partir de corps momifiés [Ruffer, 1911]. Le développement de ces pathologies repose donc sur un ensemble de causes sous-jacentes.

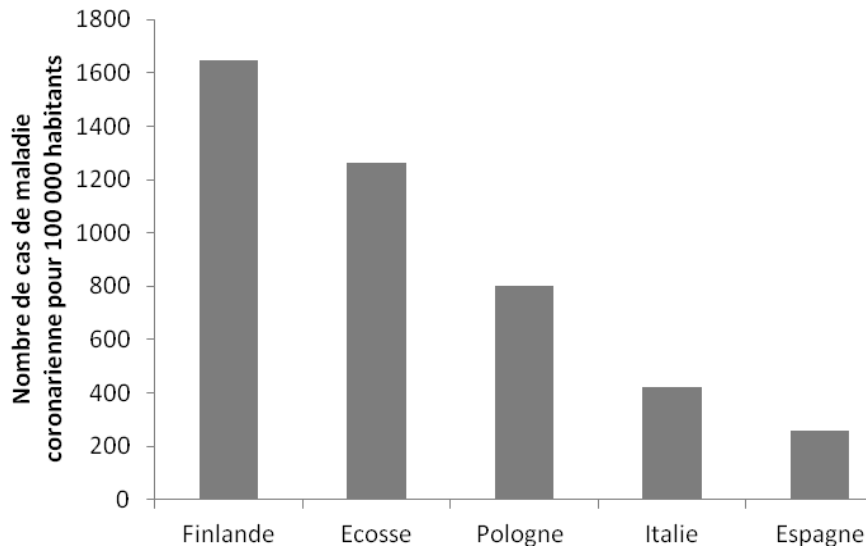


Figure 1 : Fréquence de la maladie coronarienne en Europe : mise en évidence d'un gradient Nord-Sud (exprimé en nombre pour 100 000 habitants) - projet MONICA (d'après Tunstall-Pedoe et al., 1994).

Ainsi, le développement des MCV est intimement lié à la présence de facteurs de risques. Il en existe de nombreux, répartis en deux groupes : les facteurs de risques non modifiables (âge, sexe masculin, antécédents familiaux) et les facteurs environnementaux modifiables (alimentation riche en graisses et en sucre, inactivité, tabagisme). Ainsi l'âge, l'hypercholestérolémie associée aux LDL (l'hyperLDLémie) une hypertension artérielle, la présence de diabète, la consommation de cigarettes ou encore l'obésité sont autant d'éléments pouvant augmenter le risque de survenue de MCV. S'ils peuvent être utilisés comme des témoins prédictifs de ces risques [Wilson *et al.*, 1998], ces éléments sont en partie responsables d'une surmortalité par infarctus ou AVC dont l'origine peut être souvent liée à la présence de plaques d'athérome devenues instables (rupture de plaque, thrombus) [Libby, 2001]. Ces plaques, signe d'une athérosclérose (pathologie faisant l'objet de ce travail de thèse), se développent tout au long de la vie de l'individu. Avant de définir plus précisément ce qu'est l'athérosclérose, nous allons nous intéresser à la structure des vaisseaux.

2. Structure des vaisseaux

Nous ne parlerons ici que de la structure des artères du système vasculaire systémique. Plusieurs types tissulaires se succèdent pour former la structure de l'artère (Figure 2), avec de la lumière vers l'extérieur du vaisseau :

- L'endothélium,
- Le tissu conjonctif fibro-élastique,
- La limitante élastique interne (LEI),
- Les cellules musculaires lisses (CML),
- La limitante élastique externe (LEE),
- Le tissu conjonctif avec le vasa-vasorum et les nerfs.

L'endothélium est constitué d'une couche de cellules tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins et est en contact avec le sang. Il joue un rôle capital dans la régulation du tonus vasculaire (*via* notamment la voie du NO) et le contrôle de l'hémostase. Les tissus élastiques assurent aux vaisseaux leur déformabilité et ce, de façon réversible. Les cellules musculaires permettent quant à elles la vasomotricité (vasoconstriction et vasodilatation). Enfin, l'innervation et l'apport sanguin aux vaisseaux se font *via* les réseaux développés au sein du tissu conjonctif bordant ces derniers.

D'un point de vue fonctionnel, les artères sont classiquement décrites comme formées de trois zones distinctes, composées des différents types cellulaires précédemment évoqués :

- **L'intima** : elle est constituée de l'endothélium, du tissu conjonctif fibro-élastique et de la LEI.

- **La média** : C'est le constituant principal de l'artère (en volume). Elle est composée de cellules musculaires lisses et de la LEE.
- **L'adventice** : Composée de tissu conjonctif, elle assure l'ancrage des artères aux structures avoisinantes. Elle est irriguée par les vasa-vasorum qui nourrissent l'adventice et la média. C'est également là que se trouve un réseau de nerfs vasomoteurs qui rejoint les fibres musculaires lisses de la média.

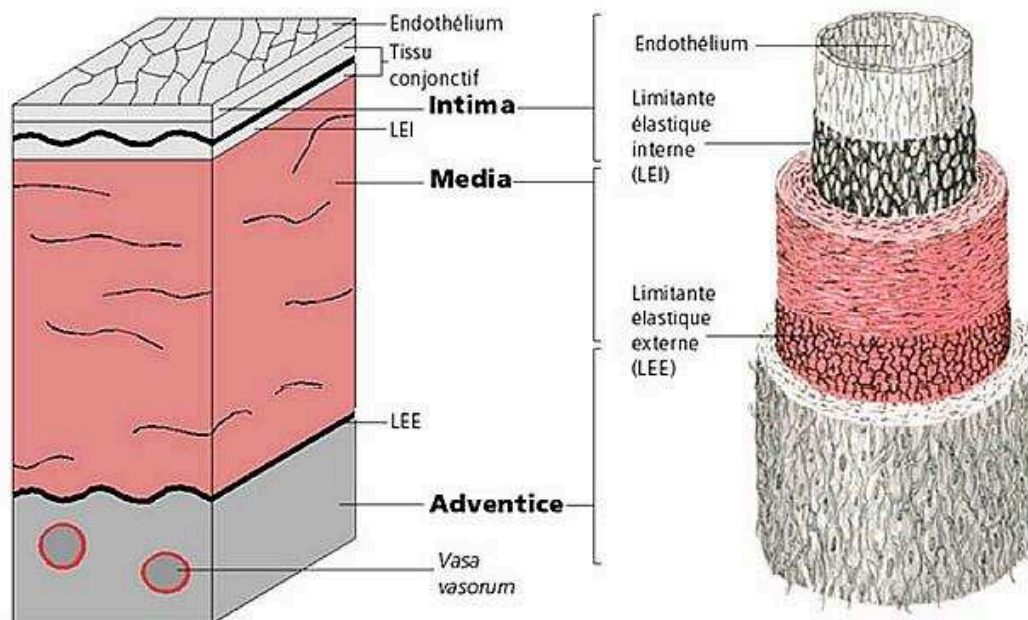


Figure 2 : Schéma représentant l'organisation de la paroi d'une artère.

Deux grands types d'artères peuvent être différenciés, les artères de conduction et les artères de distribution. Les artères de conduction sont de plus gros calibre, avec une prédominance des fibres élastiques contrairement aux artères de distribution où les cellules musculaires lisses sont plus représentées.

3. Athérosclérose

3.1 Définition

L'athérosclérose est définie par l'OMS en 1958 comme : «association de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibres consistant en une accumulation focale de lipides, glucides complexes, de sang et de dépôts calcaires, avec remaniements de la média ». L'athérosclérose est une maladie chronique multifactorielle à évolution lente. Le développement des plaques lipidiques (composées essentiellement de cholestérol) et recouvertes d'une chape fibreuse est ainsi observé. Il débute par l'accumulation de cellules spumeuses (macrophages chargés en lipides) formant la strie lipidique. Puis, une évolution en lésions fibrolipidiques avec un cœur lipidique nécrotique recouvert d'une chape fibreuse formée des cellules musculaires lisses (CML) et des cellules de la matrice extracellulaire (MEC) est observée. Le diamètre de la lumière vasculaire peut cependant être maintenu très longtemps et ainsi l'athérosclérose rester asymptomatique. La plaque d'athérome ainsi formée peut aussi partiellement obstruer la lumière vasculaire, réduire le débit sanguin en aval et créer des douleurs type angine de poitrine (souffrance du muscle cardiaque dû à un apport insuffisant en nutriments et oxygène), souvent précurseur de problèmes plus graves comme un infarctus. La plaque compliquée, complexe, instable, peut présenter des zones d'hémorragies intraplaques, des trombus locaux, des calcifications et des processus de cicatrisation. La rupture de ces plaques peut être à l'origine d'évènements ischémiques (infarctus du myocarde, AVC) liés à l'occlusion aiguë ou subaiguë de vaisseaux par phénomène thrombotique.

3.2 Développement de la pathologie

L'athérosclérose se développe tout au long de la vie des individus et s'installe très tôt dans l'arbre artériel. En effet, des stries lipidiques ont pu être observées dans les premières semaines de vie ou même chez des fœtus de mères hypercholestérolémiques [Napoli *et al.*, 2002]. Les plaques se trouvent préférentiellement dans les artères de gros et moyen calibres (0.5 à 3 cm de diamètre externe) et dans les zones où le flux sanguin n'est plus laminaire comme les bifurcations artérielles ou les courbures des vaisseaux (notamment au niveau de la crosse aortique) [Gimbrone, 1999]. En 1992, Stary propose une classification des plaques d'athérome chez l'homme, basée sur des aspects morphologiques de ces dernières (Tableau 2).

Table 1. Classification of human atherosclerotic lesions

Classification of atherosclerotic lesion types based on microscopic and chemical composition			Conventional terms based on appearance with the unaided eye	Comments
Recommended terms		Description		
Type I	(initial lesion)	Lipoprotein accumulation in intima; lipid in macrophages; these changes discernible only microscopically or chemically; no tissue damage	None	Types I and II are sometimes combined as "early lesions"
Type II	(fatty streak)	Lipoprotein accumulation in intima; lipid in macrophages and smooth muscle cells; quantities large enough to be visible to the unaided eye but still no tissue damage	Fatty streak	
IIa	(progression-prone: colocalized with specific adaptive thickening)			
IIb	(progression-resistant)			
Type III	(preatheroma)	All type IIa changes plus multiple deposits of pooled extracellular lipid; microscopic evidence of tissue damage and disorder	None	An "intermediate" or "transitional" lesion had been suspected
Type IV	(atheroma)	All type IIa changes plus confluent mass of extracellular lipid (lipid core) with massive structural damage to intima	Fibrous plaque; fibrolipid plaque; plaque	Types IV to VIII are sometimes combined as "advanced lesions"
Type V	(fibroatheroma)	All type IV changes plus development of marked collagen and smooth muscle cell increase (cap) above lipid core		
Type VI	(complicated fibroatheroma)	All type V changes plus a thrombotic deposit, and/or hemorrhage, and/or erosion or fissure	Complicated plaque	
VIa	(thrombo-hemorrhagic)			
VIb	(thrombotic)			
VIc	(hemorrhagic)			
Type VII	(calcific lesion)	Any advanced lesion type composed predominantly of calcium; substantial structural deformity	Calcified plaque	
Type VIII	(fibrotic lesion)	Any advanced lesion type composed predominantly of collagen; lipid may be absent	Fibrous plaque	

Tableau 2 : Classification des plaques d'athérome (Stary, 1992).

En 1995 avec ses collaborateurs, il proposera une classification chronologique des étapes de la genèse de la plaque en 6 stades. Les stades 1 à 3 sont des stades de lésions pré-athéromateuses sans symptôme. Les stades 4 à 6 concernent des plaques d'athéromes pouvant potentiellement conduire à des conséquences cliniques (Figure 3).

- **Stade I (lésions) :** Observé dès les premières années de vie, il correspond à l'accumulation de macrophages dans l'espace sous-endothélial et la transformation de ces derniers en cellules spumeuses sans modification de la morphologie de l'artère.
- **Stade II (strie lipidique) :** Il correspond à la formation de stries lipidiques (surélévations linéaires faisant saillie dans l'artère) composées de cellules spumeuses et de cellules musculaires lisses. Les stries lipidiques peuvent évoluer vers la formation de plaques fibreuses ou régresser.
- **Stade III (pré-athérome) :** La formation de la chape fibreuse qui isole le centre lipidique de la lumière de l'artère est observée. Elle est composée de collagène, mucopolysaccharides, élastine, fibrine et cellules musculaires lisses clairsemées. Quelques granulomes inflammatoires peuvent également être retrouvés.
- **Stade IV (athérome et plaque d'athérosclérose) :** A ce stade, les plaques d'athérome non instables se forment. Une surélévation endo-vasculaire de 3 à 15 mm comprenant un cœur lipidique avec une couche endothéliale saine en surface est observée. Les plaques présentent un noyau lipidique et une chape fibreuse.
- **Stade V (plaque fibroathéromateuse) :** Il est caractérisé par un épaississement massif de l'intima. Un processus de calcification aboutissant à

un durcissement de la plaque appelée alors plaque fibrocalcaire peut également se produire.

- **Stade VI (plaque compliquée) :** Ce stade correspond à une plaque instable suite à une rupture, une thrombose ou de l'érosion. Une hémorragie intra-plaque peut être observée.

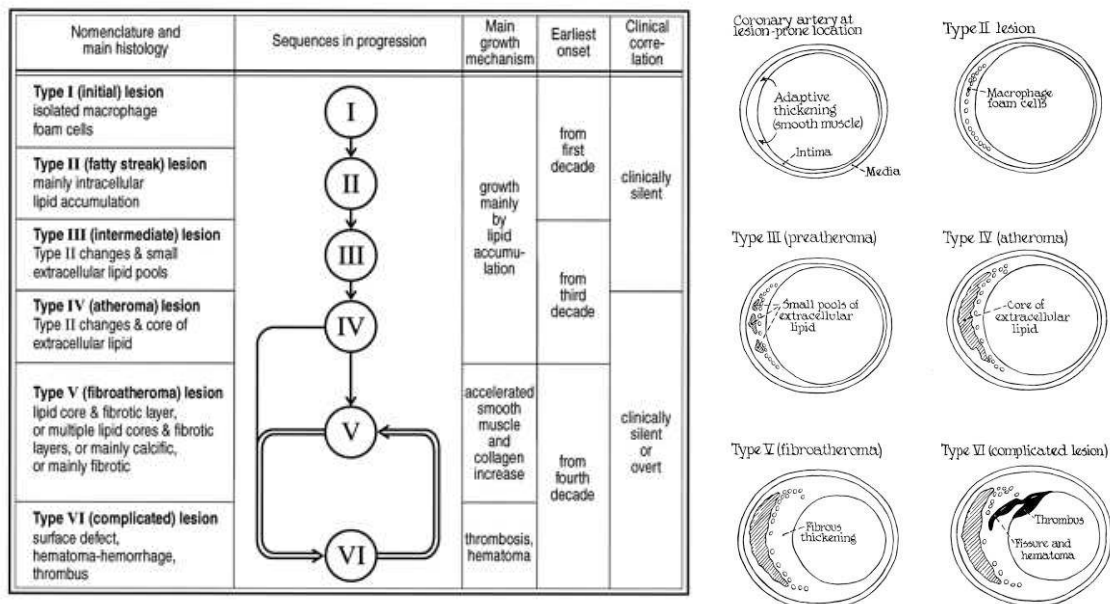


Figure 3 : Chronologie de la progression des plaques d'athérome (Stary *et al.*, 1995).

Cette classification de Stary *et al.* (1995) commence à mettre en évidence des phénomènes d'évolution mais également de retour des plaques à des stades de développements antérieurs. En effet, il est aujourd'hui communément admis que le développement des plaques d'athérome ne suit pas une évolution unidirectionnelle. Les différents stades d'évolution peuvent avoir des durées très variables d'un individu à l'autre, voir d'une plaque à l'autre. Des régressions sont également possibles et les complications sont multiples (calcification, hémorragies intra-plaques, thrombus local, érosion, rupture complète). Par ailleurs, les conséquences cliniques sont variables avec un grand nombre d'athéroscléroses asymptomatiques.

En effet, des phénomènes de compensation (positive ou négative) peuvent se mettre en place dans le vaisseau en réponse au développement de l'athérosclérose.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons à trois grandes étapes de développement de cette pathologie:

3.2.1 Initialisation et strie lipidique

Historiquement, la première hypothèse d'initialisation de l'athérosclérose fut avancée par Virchow au 19^e siècle et repris par Ross *et al.* en 1977. Il s'agissait d'une athérogenèse par absorption de lipides plasmatiques par l'intima à la suite d'un traumatisme mécanique de l'endothélium. En 1989, Taylor et ses collaborateurs mettent en évidence que des lésions athéromateuses peuvent apparaître sans altération préalable de l'endothélium. Il s'en est suivi quantité d'études mettant en évidence le rôle du cholestérol [Witztum & Steinberg, 1991] et la dimension inflammatoire de la pathologie dans son initialisation [Ross, 1999]. Actuellement, la théorie de la lésion mécanique a laissé la place à la notion de dysfonction endothéliale qui peut potentiellement être observée antérieurement à la strie lipidique. Dans tous les cas, une forte composante inflammatoire associée à une augmentation des phénomènes d'adhésion a été mise en évidence. En effet, avant même l'apparition de la plaque, il a été démontré une détérioration de la fonction endothéliale (diminution de la vasorelaxation) qui peut être associée à une diminution de l'activité de la NO synthase endothéliale (e-NOS) et une modification de la signalisation calcique intracellulaire [Prendergast *et al.*, 2014]. L'accumulation de lipides dans la paroi artérielle est liée à leur présence dans le compartiment sanguin. Dans la circulation sanguine, les lipides sont transportés depuis le foie vers les territoires périphériques grâce à des molécules de transport, les lipoprotéines. Il en

existe deux principaux types, le LDL (Low Density Lipoprotein ou lipoprotéines de faible densité) et le HDL (High Density lipoprotein ou lipoprotéines de forte densité). Le HDL n'est pas athérogène et va même pouvoir limiter l'effet athérogène du LDL [Parthasarathy *et al.*, 1990]. Les lipoprotéines, et en particulier celles de petite taille dont le LDL, sont capables de traverser la barrière endothéliale pour se retrouver en sous endothélial [Carmena *et al.*, 2004]. A ce moment, comme indiqué sur la figure 4, le LDL va pouvoir être oxydé, notamment par les ROS (Reactive Oxygen Species), et/ou capté par les macrophages présents [Boullier *et al.*, 2006].

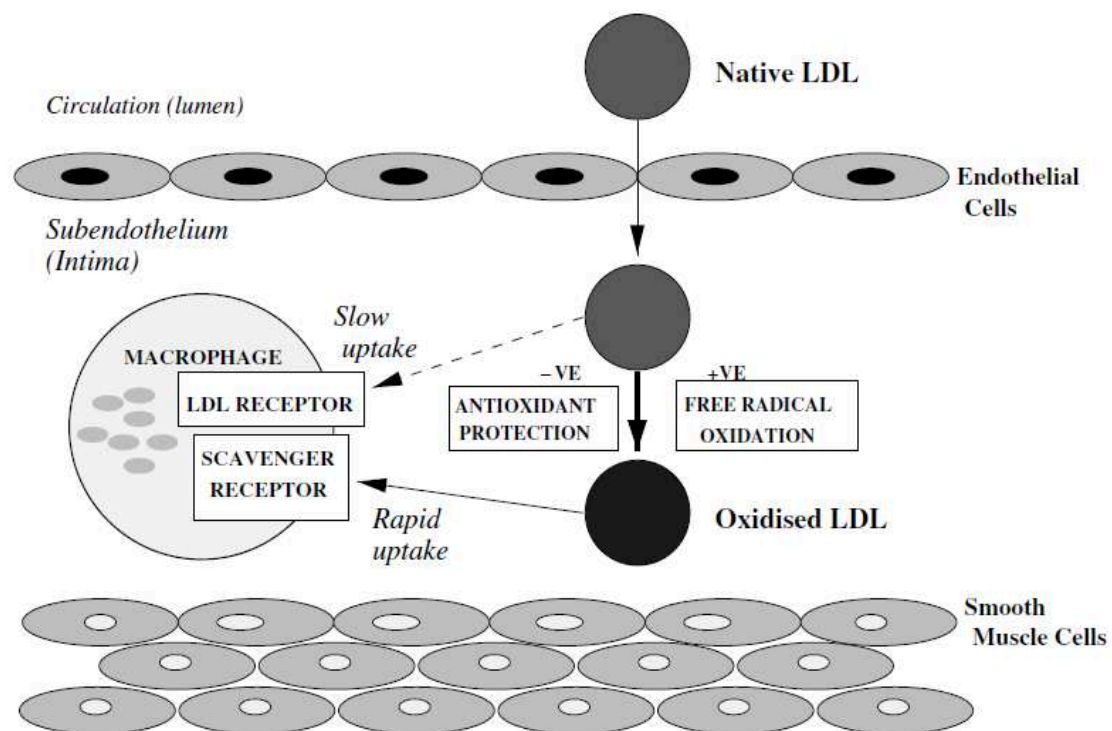


Figure 4 : Devenir du LDL après passage de l'endothélium (Cobbald *et al.*, 2002).

La présence de LDL oxydé favorise l'expression de gènes pro-inflammatoires. Les molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium se font plus nombreuses. Une accumulation de lipides circulants (pouvant être oxydés) commence à s'observer au niveau de l'endothélium (Figure 5), conduisant à la mise en place de la

strie lipidique. Par la suite, des monocytes infiltrent la paroi, prolifèrent et se différencient en macrophages, se chargent en lipides (ils captent en particulier les lipides oxydés) et deviennent des cellules spumeuses. En situation non pathologique, il existe un rétrocontrôle négatif qui réduit l'expression des récepteurs aux lipoprotéines et empêche leur accumulation dans les macrophages [Keaney et al., 1999]. Ces étapes précurseurs de l'apparition de plaques d'athérome se déroulent tout au long de la vie des individus et sont tout à fait asymptomatiques.

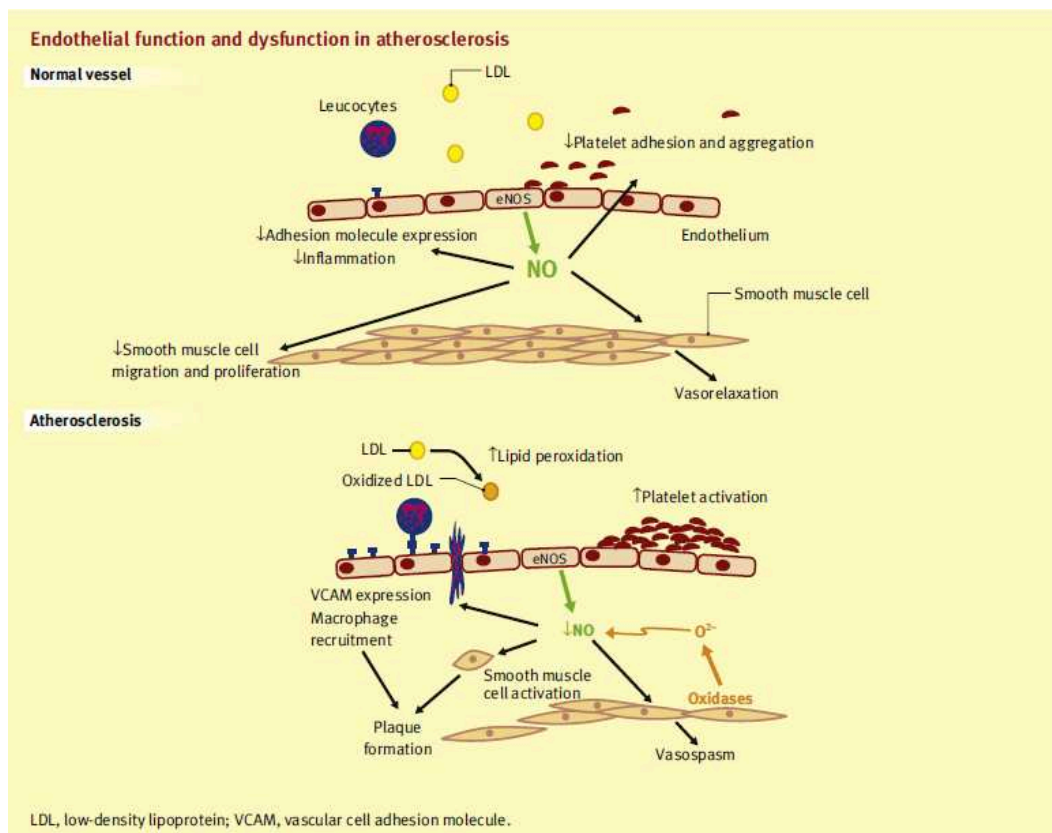


Figure 5 : Dysfonction endothéliale et initialisation de la strie lipidique (Douglas & Channon, 2010).

3.2.2 Mise en place du noyau lipidique

A ce stade, les lésions sont présentes sous forme de plaques d'athérome vraies, la lésion fait saillie dans la lumière du vaisseau et un noyau lipidique est

visible (centre inflammatoire). Trois zones distinctes dans la plaque peuvent alors être différenciées :

- **La chape fibreuse** : En réponse à des cytokines et des facteurs de croissances, des cellules musculaires lisses (CML) vasculaires migrent, prolifèrent et synthétisent des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) comme du collagène ou de l'élastine. La chape fibreuse est présente entre le cœur lipidique fortement thrombogène et l'endothélium, limitant ainsi le risque de thrombose et stabilisant la plaque. Elle est composée de CML et de protéines matricielles et ne contient que très peu de macrophages, cellules dendritiques et cellules T.
- **Le cœur lipidique** : Durant sa croissance, il devient apoptotique puis nécrotique. A ce dernier stade il peut y avoir un relargage de lipides cellulaires dans le milieu extracellulaire ainsi que des débris cellulaires (« Bouillie » lipidique athéromateuse) [Nalbone *et al.*, 2006].
- **Le vaso-vasorum** : A ce niveau on observe la présence de macrophages, de cellules dendritiques et de cellules T. C'est une zone d'expression intense de protéines d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et E-selectine : le vaso-vasorum est impliqué dans le recrutement de monocytes pour la plaque depuis les régions néo-vascularisées.

C'est à ce stade que l'on peut observer des remodelages artériels (Figure 6). Une artère peut faire du remodelage positif (« positive remodelling ») en modifiant ses dimensions extérieures sans modifier le diamètre interne, la lésion est alors asymptomatique. A l'inverse, le diamètre externe de l'artère peut ne pas être modifié et le volume de la plaque être présent dans la lumière vasculaire. C'est le

remodelage négatif (« negative remodelling ») qui, créant une sténose artérielle et une ischémie tissulaire, peut devenir symptomatique.

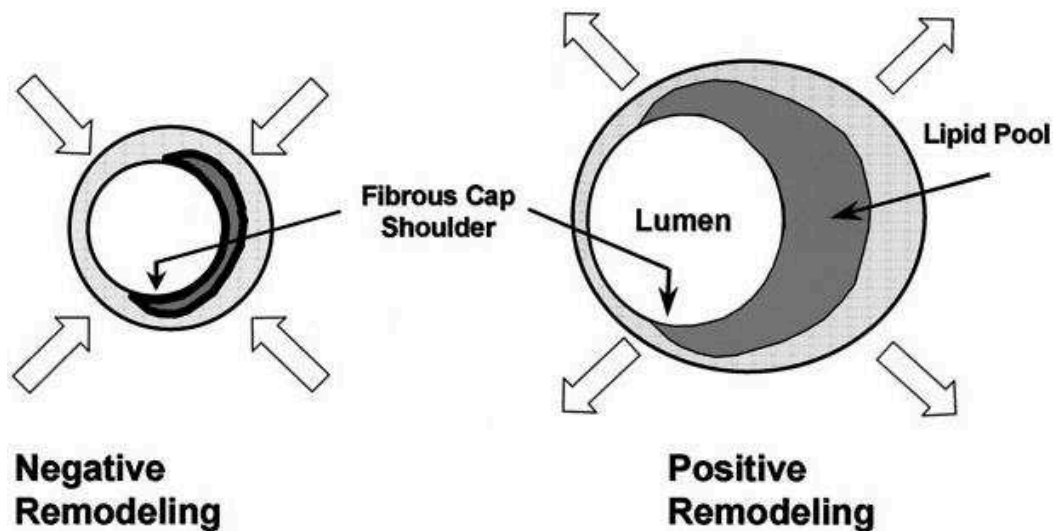


Figure 6 : Remodelages artériels positif et négatif (Schoenhagen et al., 2001).

3.2.3 Plaque instable et risque de rupture

La plaque instable est le stade le plus accidentogène de la pathologie. En effet les plaques peuvent être fragilisées et se rompre, se détacher totalement ou créer un thrombus [Fuster *et al.*, 2005 ; Insull, 2009]. Ces éléments vont pouvoir partir librement dans la circulation et obstruer des artères de plus petits calibres, créant ainsi des accidents vasculaires aigus (accident vasculaire cérébral, infarctus du myocarde) qui peuvent mettre en péril la survie du patient ou laisser des séquelles irréversibles.

Il reste très difficile de caractériser et d'identifier une plaque vulnérable. La vulnérabilité de la plaque dépend de plusieurs facteurs comme le stress appliqué à la

paroi, les caractéristiques du flux sanguin, sa localisation, sa taille, et sa composition [Davies *et al.*, 1993 ; Falk *et al.*, 1995 ; Virmani *et al.*, 2000]. On peut cependant décrire une plaque instable (ou vulnérable) comme présentant un contenu lipidique important et oxydé, de couleur jaune avec une chape fibreuse fine. L'inflammation joue un rôle majeur dans l'évolution de la plaque vers une forme instable et dans la rupture de la plaque [Ross, 1993], avec une forte concentration en métalloprotéases. La quantité de cellules musculaires lisses est souvent réduite à ces endroits du vaisseau et on peut observer des hémorragies intra-plaques. D'après Virmani *et al.* (2000), il existe 3 types de plaques vulnérables : la plaque rompue (60 à 75% des cas), la plaque érodée (25 à 40%) et la plaque présentant des microparticules calcaires en superficie (2 à 7%).

La survenue de ruptures des plaques peut dépendre de plusieurs facteurs :

- **des facteurs intrinsèques** comme les caractéristiques du noyau lipidique (supérieur à 40% du volume total de la plaque) ou de la chape fibreuse (chape fine sur un noyau lipidique imposant, une quantité de protéines de la MEC, notamment collagène et élastine réduite) [Loree *et al.*, 1992 ; Davies *et al.*, 1993]. L'inflammation joue aussi un rôle crucial *via* la production de cytokines pro-inflammatoires, de métalloprotéases ou de molécules pro-coagulantes comme les facteurs tissulaires au niveau de l'endothélium. L'apoptose participe également à la fragilisation de ces plaques [Mallat & Tedgui, 2000] tout comme la rupture de néo-vaisseaux [Kockx *et al.*, 2003].

- **des facteurs extrinsèques** peuvent aussi favoriser la rupture de plaque et en particulier les forces biomécaniques (circonférentielles ou longitudinales) ou hémodynamiques.

4. Athérosclérose : détection et quantification

Certaines plaques qui se rompent n'ont pas les caractéristiques typiques d'une « plaque instable ». De même, certaines ruptures de plaques sont cliniquement silencieuses. Ainsi, il est difficile de prédire l'évolution de cette pathologie dont les éléments constitutifs (plaques) peuvent être à un instant donné dans une grande variété d'états. Pour cela, la notion de patient vulnérable à vue le jour. Elle prend en compte les notions de plaque vulnérable, sang vulnérable et myocarde vulnérable [Naghavi & Falk, 2010]. Pour avoir une évaluation du risque cardiovasculaire, les facteurs de risques de chaque patient sont évalués ainsi que la rythmologie cardiaque et ses éventuelles anomalies électro-physiologiques. Même s'il n'existe pas de méthode quantitative d'évaluation de l'état de progression l'athérosclérose, il est possible d'approcher certains paramètres prédictifs. Ainsi, certains marqueurs sériques peuvent être quantifiés. En effet, au niveau sanguin, certains paramètres se trouvent augmentés en cas de risque cardiovasculaire particulièrement élevés comme les LDL, la protéine C réactive (CRP), les facteurs d'adhésion (VCAM, ICAM, Psélectine) ou certaines métalloprotéases (Tableau 3).

Serological markers of vulnerability (reflecting metabolic and immune disorders)

Abnormal lipoprotein profile (e.g., high LDL, low HDL, abnormal LDL and HDL size density, lipoprotein [a], etc.)

Nonspecific markers of inflammation (e.g., hsCRP, CD40L, ICAM-1, VCAM-1, P-selectin, leukocytosis, and other serological markers related to the immune system; these markers may not be specific for atherosclerosis or plaque inflammation)

Serum markers of metabolic syndrome (e.g., diabetes or hypertriglyceridemia)

Specific markers of immune activation (e.g., anti-LDL antibody, anti-HSP antibody)

Markers of lipid peroxidation (e.g., ox-LDL and ox-HDL)

Homocysteine

PAPP-A

Circulating apoptosis marker(s) (e.g., Fas/Fas ligand, not specific to plaque)

ADMA/DDAH

Circulating nonesterified fatty acids (e.g., NEFA)

hsCRP high-sensitivity CRP; *CD40L* CD40 ligand; *ICAM* intracellular adhesion molecule; *VCAM* vascular cell adhesion molecule; *MMP* matrix metalloproteinases; *TIMP* tissue inhibitors of MMPs; *LDL* low-density lipoprotein; *HDL* high-density lipoprotein; *HSP* heat shock protein; *ADMA* asymmetric dimethylarginine; *ADMA* dimethylarginine dimethylaminohydrolase; *NEFA* nonesterified fatty acids

Tableau 3 : Principaux marqueurs sériques impliqués dans la détermination du risque cardiovasculaire (Naghavi & Falk, 2010).

Afin de déterminer l'état d'évolution de plaques d'athérome situées dans certaines régions prédisposées (carotides, coronaires), des méthodes d'imagerie médicale ont également été développées. La visualisation de ces plaques permet de poser un diagnostic sur certaines affections et d'intervenir chirurgicalement (pose de stent) si besoin.

Différentes techniques d'imagerie sont utilisées et différentes cibles possibles (Tableau 4). L'objectif est le développement de techniques simples, peu coûteuses, répétables, le moins invasives possible, sans irradiation et à forte résolution.

Type d'imagerie	Principe utilisé	Cible possibles	Irradiation	Invasif	Résolution
PET (Positron Emission Tomography)	Rayons gamma	Macrophages Glucose Molécules d'adhésion Structure tridimensionnelle	oui	Non	1.7à7mm
CT et UFCT (Ultrafast) Computed Tomography)	Rayons X	Molécules d'adhésion Remodelage Structure tridimensionnelle	oui	Non	200µm
SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)	Rayons gamma	Macrophages Apoptose remodelage	oui	non	1mm
Echographie trans-œsophagienne	ultrasons	Structure tridimensionnelle	non	Non	400µm
Scanner	Rayons X	macrophages	oui	non	
Angiographie	Rayons X	Structure tridimensionnelle	oui	oui	
IVUS (IntraVascular UltraSound)	ultrasons	Structure tridimensionnelle	non	Oui	100-250µm
IRM (Image par Résonance Magnétique)	Résonance magnétique	Macrophages Molécules d'adhésion Néo-vascularisation Thrombose Structure tridimensionnelle	non	Non	300µm
OCT (Optical Coherence Tomography)	infrarouge	Thrombose Structure tridimensionnelle	non	Oui	10µm

Tableau 4 : Méthodes d'imageries médicales utilisables pour la visualisation de plaques d'athérome (d'après Fayad & Fuster, 2001 ; De Dreuille et al., 2002 ; Kusters et al., 2012).

5. Athérosclérose et moyens thérapeutiques

Les méta-analyses mettent en évidence une augmentation sans équivoque du risque cardio-vasculaire avec une cholestérolémie importante. En particulier, les LDL oxydés (LDLox) jouent un rôle prépondérant dans la genèse et le développement des plaques d'athérosclérose. Les LDLox ont des effets pro-apoptotiques qui peuvent être modulés par des protéines chaperonnes [Ingueneau *et al.*, 2010] et sont impliqués dans la formation du cœur nécrotique et potentiellement dans l'instabilité des plaques.

Les efforts sont donc focalisés sur la réduction du taux de cholestérol plasmatique et notamment la réduction du LDL. Le NCEP (National Cholesterol Education Program) a ainsi établi un outil de classification quantitatif et qualitatif des taux de cholestérol (Tableau 5).

LDL cholesterol (mg/dL)		
<100		Optimal
100-129		Near optimal/above
130-159		optimal
160-189		Borderline high
>190		High
		Very high
Total cholesterol (mg/dL)		
<200		Desirable
200-239		Borderline high
>240		High
HDL cholesterol (mg/dL)		
<40		Low
>60		High

Tableau 5 : Classification des concentrations sériques en cholestérol total, LDL, HDL en mg/dL (NCEP, 2001).

Les modifications des habitudes alimentaires et de la lutte contre la sédentarité sont les piliers de la prévention primaire de l'athérosclérose. Ainsi, la réduction des graisses saturées et du cholestérol de l'alimentation, l'augmentation de la consommation de fruits et légumes, une activité physique régulière ou encore le contrôle du poids font partie des recommandations de la prévention primaire de cette pathologie (c'est-à-dire avant la survenue du premier accident cardiovasculaire aigu). Ces recommandations sont également à intégrer à la prévention secondaire (après la survenue du premier évènement cardiovasculaire aigu, pour limiter les récurrences) en complément d'une prise en charge médicamenteuse.

En prévention secondaire, les patients reçoivent généralement un traitement par statine. En prévention primaire, cette pratique se met en place progressivement. Les statines inhibent de façon compétitive la HMG-CoA reductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA reductase), l'enzyme limitante de la biosynthèse du cholestérol. En effet l'HMG-CoA réductase médie la conversion de l'HMG-CoA en mévalonate (Figure 7). Les statines inhibent donc la synthèse de cholestérol par le foie et augmentent l'absorption de cholestérol, notamment dans sa forme LDL.

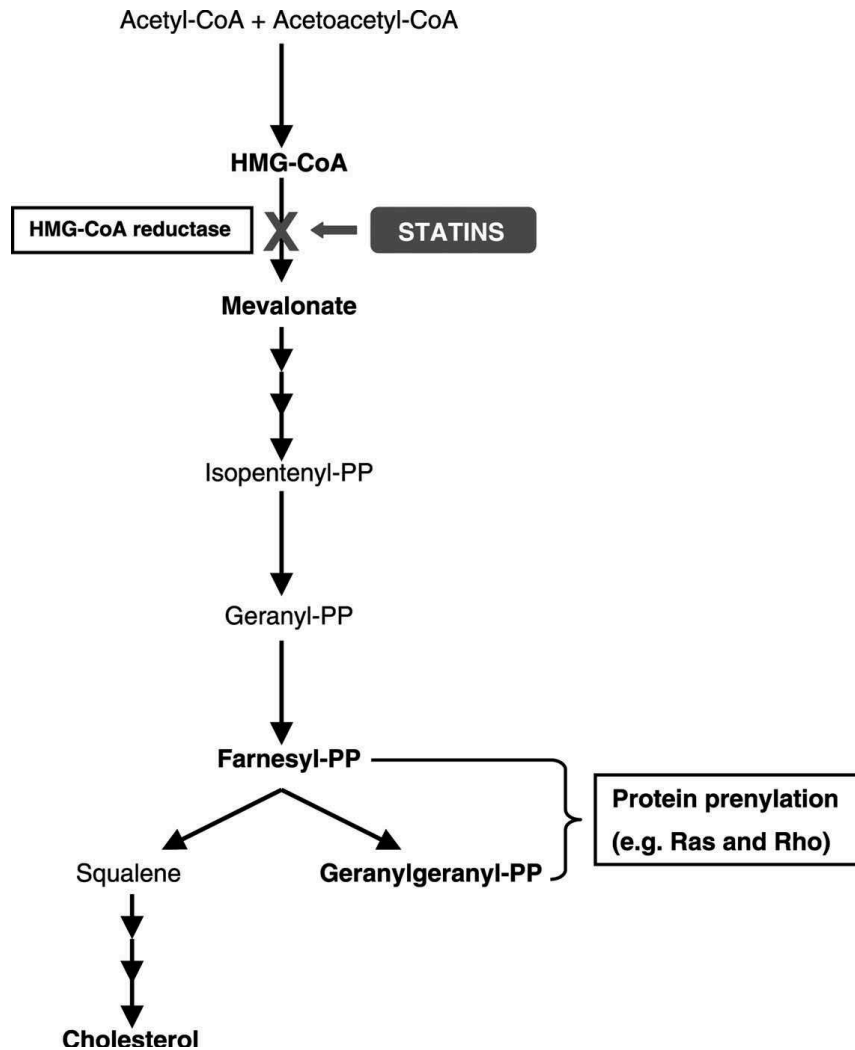


Figure 7 : Action des statines sur la synthèse du cholestérol (Bonetti *et al.*, 2003).

La première statine, la compactine, a été découverte en 1973 par Akira Endo ; [Endo *et al.*, 1976]. Sept statines sont actuellement disponibles : atorvastatine, fluvastatine, lovastatine, pitavastatine, pravastatine, rosuvastatine, simvastatine. Elles représentent un traitement de choix de l'hypercholestérolémie. Plus de 30 millions de personnes à travers le monde sont ainsi traités par statine avec une diminution d'évènements coronariens de 25 à 45% [Jukema *et al.*, 2012]. Mais, la diminution de la cholestérolémie induite par les statines n'est pas le seul élément responsable de la baisse de mortalité et morbidité liées à la prise de ce traitement

[Davignon, 2004]. En effet, les statines ont des effets pléiotropes protecteurs vis-à-vis du système cardiovasculaire dépendants et indépendants de la baisse du LDL circulant [Liao & Laufs, 2005 ; Wang *et al.*, 2007]. Au niveau vasculaire, de nombreux effets sont observés. Elles limitent par exemple la dysfonction endothéliale en améliorant la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) [Davignon *et Ganz*, 2004 ; Bonnet, 2012]. Elles ont également une action stabilisante sur la plaque d'athérome [Crisby *et al.*, 2001 ; Bonnet, 2012] par leurs actions au niveau des lipides bien évidemment mais aussi leurs actions anti-inflammatoires [Ascer *et al.*, 2004 ; Rezaie-Majd *et al.*, 2003 ; Tang *et al.*, 2009] et immuno-modulatrices [Hakamada *et al.*, 2003 ; Fehr *et al.*, 2004]. Ces différentes actions vont permettre au niveau des plaques d'athérome de limiter le centre nécrotique [Hong *et al.*, 2009] et modifier l'épaisseur de la chape fibreuse [Takarada *et al.*, 2009] ou sa composition [Shiomi *et al.*, 2001 ; Kiyama *et al.*, 2007], limitant ainsi l'évolution de la pathologie vers la plaque vulnérable instable. L'augmentation de l'épaisseur intima-média [Peters *et al.*, 2012] ainsi que la limitation du développement du vasa-vasorum [Michel *et al.*, 2011] va limiter le risque vasculaire lié à la rupture de plaque [Peters *et al.*, 2011]. A fortes doses (atorvastatine 80mg/jour), les statines peuvent arrêter la progression des lésions coronaires [Nissen *et al.*, 2004], voir les faire régresser (rosuvastatine 40 mg/J) [Nissen *et al.*, 2006]. Au niveau cardiaque, les statines ont un effet protecteur *via* notamment leurs effets antioxydants (Figure 8).

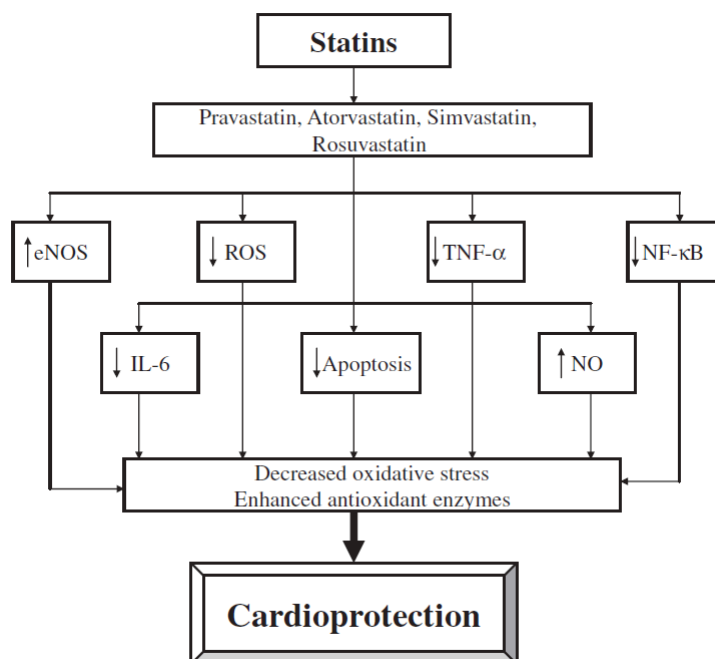


Figure 8 : Voies de signalisations impliquées dans l'effet cardioprotecteur des statines (Rohilla et al., 2011).

Parmi les statines, la plus communément prescrite est l'acide (3R,5R)-7-[2-(4-fluorophenyl)-3-phenyl-4-(phenylcarbamoyl)-5-(propan-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanoïque ou atorvastatine (Figure 9). Elle a un effet hypolipidémiant démontré, y compris chez le sujet humain souffrant d'hypercholestérolémie familiale homozygote [Raal et al., 2000].

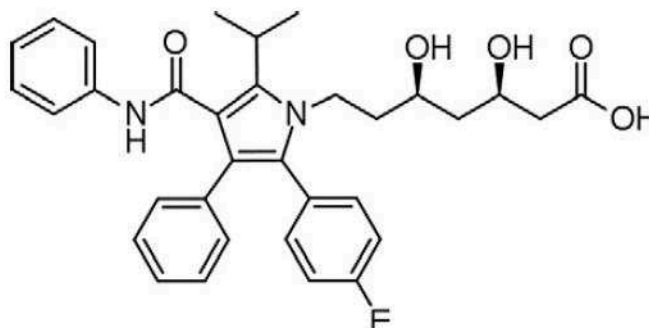


Figure 9 : Structure chimique de l'atorvastatine.

Chez l'animal, l'effet hypolipidémiant des statines est fonction de l'espèce. Les effets sont visibles chez les hamsters, les lapins, les chiens, les singes, les poules mais pas chez les rats et les souris [Endo, 1992]. La posologie appliquée chez l'homme entraîne une diminution du cholestérol total d'environ 25 à 30% [Andrews *et al.*, 2001]. Utilisée de façon intensive, avec une réduction du cholestérol plasmatique inférieure à 100 mg/dL, les statines peuvent réduire le risque d'accident vasculaire aigu de 50% mais avec une augmentation significative du risque de myopathie [CTT collaboration, 2010]. En effet, bien que généralement bien tolérés, les statines peuvent induire des effets indésirables, observés sur un nombre restreint d'individus : augmentation d'enzymes hépatiques, atrophie musculaire, rhabdomyolyse, atteinte des fonctions cognitives (dégénérescence), cancer ou encore diabète. Une interruption ou une réduction de la prise de statine suffit généralement à faire disparaître les effets hépatiques et musculaires. En ce qui concerne les autres affections, leur lien avec la prise de statine est très controversé. Une étude a tenté d'évaluer la possibilité d'effets négatifs à long terme liés à la prise de statines et a conclu qu'il n'y avait pas de risque accru sur le déclin cognitif ou l'apparition de cancer avec un traitement par statine mais une faible élévation du risque de développer un diabète de type 2 [Jukema *et al.*, 2012].

Actuellement, les statines sont prescrites avec pour objectif de baisser le cholestérol circulant de manière significative. C'est d'ailleurs sur ce critère que la posologie est adaptée à chaque patient dans une fourchette de dose recommandée (10 à 80 mg/jour pour l'atorvastatine, 10 à 40 mg/jour pour la pravastatine, et la simvastatine, 20 à 80 mg/jour pour la fluvastatine et la lovastatine) afin d'atteindre les objectifs NCE. Ces derniers sont pour le LDL cholestérol :

- ≤ 100 mg/dL en cas de maladie coronarienne,
- < 130 mg/dL en cas de présence de deux facteurs de risques ou plus,
- < 160 mg/dL si il existe aucun ou un facteur de risque [NCEP, 2001].

6. Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ce travail de thèse est d'étudier les effets à long terme de l'atorvastatine (statine fréquemment prescrite) à faible dose sur le développement de l'athérosclérose. Le développement des techniques d'imagerie en permettant de détecter de plus en plus précocement cette pathologie permet en effet d'envisager la mise en place d'une prise en charge personnalisée des patients. Ceci implique d'adapter, au cas par cas, les posologies, les durées de traitement et les médicaments associés en fonction des conditions cliniques, de l'âge et de la sévérité de la pathologie. Aujourd'hui, les statines sont prescrites et les posologies ajustées pour obtenir un effet hypolipidémiant significatif. Toutefois, à ces doses, des effets indésirables peuvent être observés, notamment avec des durées de traitement longues. De plus, en dehors de tout effet hypolipidémiant, les statines possèdent des propriétés pléiotropes bénéfiques pour l'ensemble du système cardiovasculaire. L'idée originale de cette thèse est donc de réduire les doses utilisées dans une optique de traitement précoce et à long terme afin de limiter les éventuels effets indésirables.

Ce travail a été réalisé sur un modèle animal particulièrement intéressant pour ce type d'étude : le lapin watanabe. Depuis plus de cent ans, des modèles animaux ont été développés pour l'étude de l'athérosclérose [Jackson *et al.*, 2010]. Ces

modèles sont utilisés non seulement pour comprendre sa pathophysiologie mais aussi pour développer des traitements dédiés [Zaragoza *et al.*, 2011]. La plupart de ces modèles sont rendus hyperlipidémiques soit par supplémentation alimentaire en cholestérol soit par manipulation génétique [Narayanaswomy *et al.*, 2000]. L'espèce la plus couramment utilisée est la souris [Jawien *et al.*, 2004]. De petite taille, son utilisation et son hébergement sont aisés ainsi que sa manipulation génétique (suppression de apo B, apoE ou d'un récepteur au LDL). La disposition des plaques ne correspond cependant pas à la répartition retrouvée chez l'Homme [Getz & Reardon, 2012] mais ce modèle a grandement participé à la compréhension de la pathologie, notamment dans ses aspects génétiques. Les gros animaux (porcs, lapins, primates non humains, chiens) sont plus coûteux et moins faciles d'utilisation (avec, en particulier, des temps d'induction des plaques beaucoup plus longs). Mais, ils présentent des évolutions de plaques plus proches de ce qui se passe chez l'Homme en comparaison des rongeurs ou des oiseaux [Vilahur *et al.*, 2011]. Il est possible chez ces modèles d'observer des développements spontanés de plaques suite à un régime riche en lipides. Les primates sont évidemment les plus proches de la physiopathologie humaine mais leur utilisation doit être limitée. Parmi les « gros » animaux, le lapin est le plus utilisé [Yanni, 2004 ; Fan *et al.*, 2014] et notamment le lapin de Nouvelle-Zélande. Ce modèle nécessite une alimentation riche en lipides et une intervention mécanique sur l'endothélium *via* l'insertion d'un ballonnet gonflable pour altérer ce dernier et initier la plaque [Zhang *et al.* 2012].

Pour ce travail de thèse, nous avons recherché un modèle qui répondait au plus grand nombre des critères suivants :

- avoir une évolution des plaques proche de celle retrouvée chez l'Homme (strie lipidique, plaque d'athérome, plaque instable),

- présenter des ruptures de plaques spontanées,
- avoir des plaques inflammatoires (présence de macrophages),
- avoir un profil lipoprotéique similaire à l'Homme,
- avoir une taille permettant l'utilisation de l'imagerie médicale,
- avoir une réponse au traitement par statine,
- être compatible avec le budget et l'hébergement disponible.

Découvert en 1973 par Yoshio Watanabe, le lapin Watanabe (Figure 10) ou WHHL (Watanabe heritable hyperlipidemic) répond à une grande partie de ces critères.

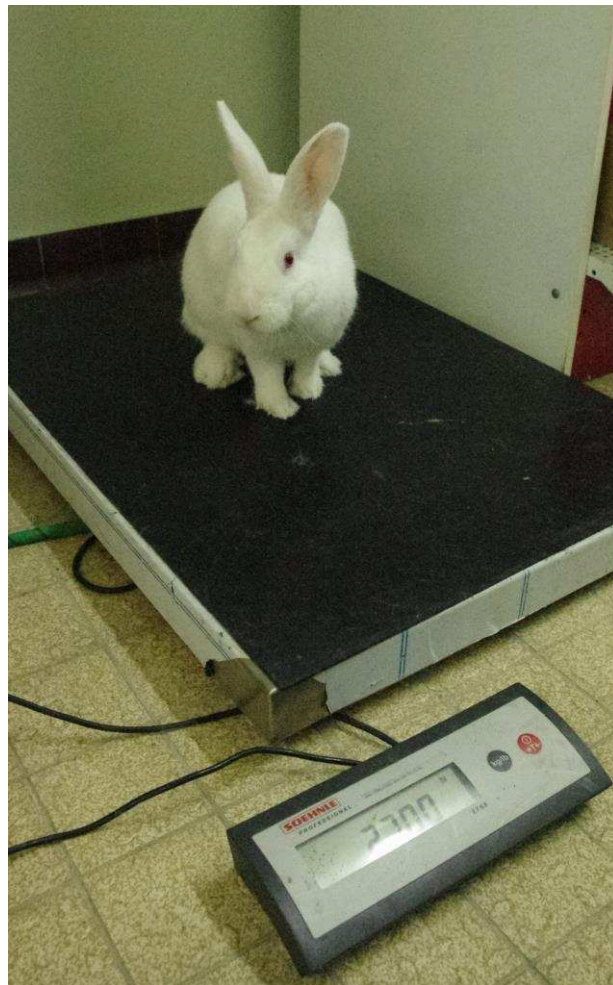


Figure 10 : Lapin Watanabe mâle adulte lors d'une pesée.

En effet, il présente une hypercholestérolémie familiale [Watanabe, 1980] due à une mutation spontanée d'un récepteur au LDL [Tanzawa *et al.*, 1980 ; Kita *et al.*, 1981] et possède un profil lipoprotéique proche de ce qui peut être retrouvé chez l'Homme [Kobayashi *et al.*, 2011]. De plus, cet animal sélectionné (Figure 11), non transgénique, n'a pas besoin d'une complémentation alimentaire ni de chirurgie pour développer des plaques d'athérome avec l'âge [Shiomi & Ito, 2009].

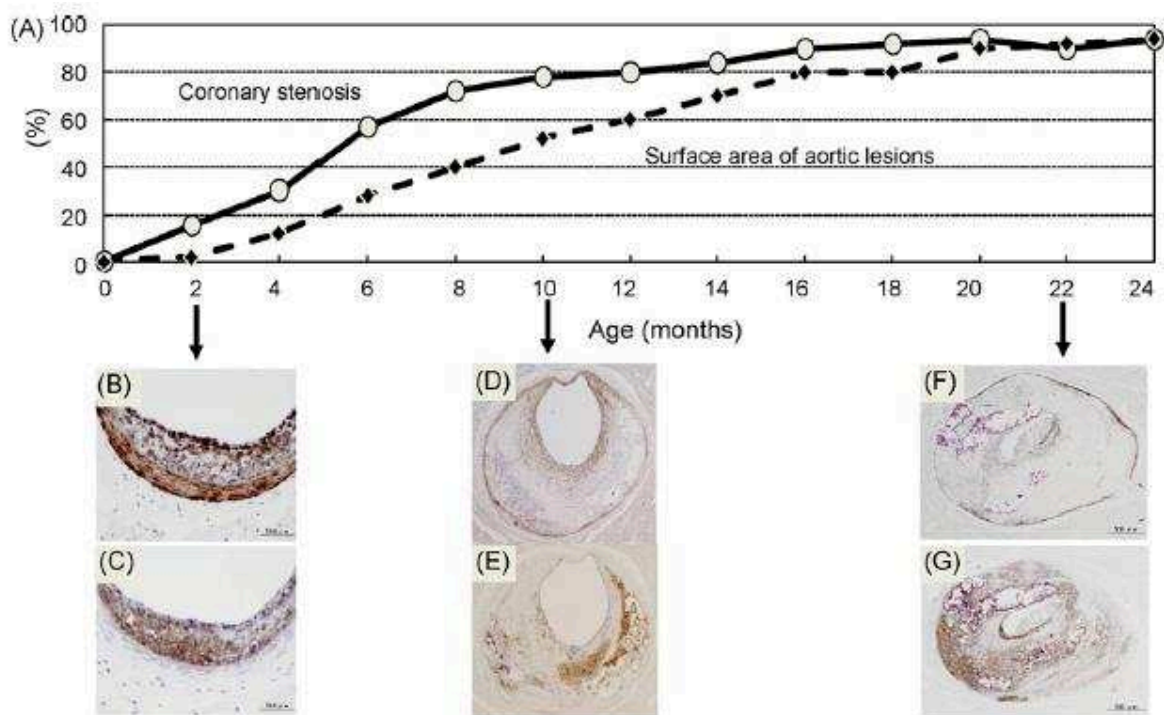


Figure 11 : Développement des lésions athéromateuses chez le lapin Watanabe au cours du temps (A) et exemples de coupes de plaques avec marquage des cellules musculaires lisses par 1A4 (B, D, F) et macrophages par RAM11 (C, E, G) (Shiomi et Ito, 2009).

Par ailleurs, ses plaques sont très proches de celles retrouvées chez l'Homme [Buja *et al.*, 1983 ; Shiomi *et al.*, 1994], allant de la strie lipidique à la plaque instable avec une composante inflammatoire et des localisations préférentielles semblables à celles observées chez l'Homme, notamment au niveau de la crosse aortique et des

coronaires [Koike *et al.*, 2005 ; Kobayashi *et al.*, 2011]. Chez ce modèle, le développement de l'athérosclérose peut conduire spontanément à des infarctus du myocarde [Shiomi *et al.*, 2003 ; Ito *et al.*, 2004]. De plus, il répond à un traitement par statines et a participé au développement de ces molécules [Shiomi *et al.*, 1999 ; Miyazahi & Koga, 2002 ; Shiomi *et al.*, 2013]. Ainsi, avec un traitement à l'atorvastatine, il a été démontré, sur des lapins de 3 mois, une réduction de la concentration en cholestérol total dans le plasma à partir de deux semaines de traitement à une dose équivalent à 6 mg/Kgbw/jour et une limitation de 16% de la surface occupée par les plaques au bout de 16 semaines [Li *et al.*, 2014]. Enfin, de taille moyenne, son hébergement et son utilisation en imagerie médicale humaine sont possibles.

Afin d'apporter des éléments de réponse à notre objectif initial, une expérimentation d'une durée de 9 mois a été mise en place. 42 lapins Watanabe mâles âgés de trois mois (Elevage Jeanrot, 45160 Olivet, France) ont été hébergés à l'école nationale vétérinaire de Nantes (Oniris). Après une semaine d'acclimatation, deux groupes ont été constitués : un groupe contrôle et un groupe recevant un traitement atorvastatine (atorvastatin calcium, PF-00079943-07, Pfizer) à 2.5 mg/Kg/jour. La température était maintenue constante (21 °C), les cycles jour-nuit fixés à 12h-12h. La nourriture (Lapin Clapier PDC, Le Pré du Clocher, 44155 Ancenis, France) était donnée à volonté. Le médicament a été dissout dans l'eau de boisson distribuée au premier remplissage de la journée puis de l'eau claire était donnée à volonté. Les animaux contrôles recevaient de l'eau claire à volonté. Chaque semaine, tous les animaux étaient pesés et les quantités d'atorvastatine réajustées en conséquence. Chaque mois, du sang artériel a été prélevé à partir de

l'artère médiane de l'oreille sur tube sec, citrate et EDTA. Les prélèvements ont été centrifugés immédiatement après le prélèvement et le plasma ou sérum aliquoté et congelé en azote liquide pour des dosages ultérieurs. En parallèle, à 3, 6 9 et 12 mois, des animaux ont été sacrifiés afin de suivre l'évolution de la pathologie par tomographie par cohérence optique. Différents tissus et vaisseaux ont également été prélevés afin de réaliser des études structurelles et fonctionnelles.

Une vérification des effets hypocholestérolémiants de la dose d'atorvastatine utilisée et de l'éventuelle modification des paramètres circulants marqueurs de souffrance hépatique, musculaire ou rénale a été réalisée. La concentration en cholestérol moyenne sur les neufs mois d'expérimentation est de $19,9 \pm 3,1$ mM chez les animaux contrôles et de $18,3 \pm 4,6$ mM chez les animaux traités. Il apparaît que le traitement a eu un effet hypolipidémiant transitoire au niveau du cholestérol total avec une baisse modérée sur la période 7-8-9 mois chez les animaux traités. La concentration moyenne en HDL sur les neufs mois d'expérimentations est $0,92 \pm 0,35$ mM chez les animaux contrôles et de $0,76 \pm 0,33$ mM chez les animaux traités. Au niveau du HDL, on observe également une très légère diminution sur la période 7-8-9 mois avec le traitement. En revanche aucune modification n'a été observée sur les triglycérides ou le LDL. Ce faible effet de la statine sur la lipidémie met en évidence une absorption effective du traitement par les animaux et confirme que la dose utilisée est une dose faible. Aucune modification majeure des concentrations en ASAT, ALAT et urée n'a été constatée. Ce traitement n'a donc pas d'effet délétère sur les fonctions hépatique et rénale et n'engendre pas de souffrance musculaire. Enfin, la glycémie n'est pas modifiée par le traitement et n'évolue pas au cours du temps, nous n'avons donc de mise en place de diabète de type 2. Après ces

premières mesures communes à l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse, plusieurs approches ont été développées afin d'apporter des éléments de réponse sur les effets à long-terme sur l'athérosclérose de l'atorvastatine à faible dose chez notre modèle animal. Les résultats obtenus seront présentés dans ce manuscrit au sein de 4 chapitres représentant quatre niveaux d'intégration.

Dans un **premier chapitre**, nous nous sommes intéressés à l'évolution de l'athérosclérose et en particulier à l'effet du traitement par atorvastatine à long terme et à faible dose sur cette pathologie. Ainsi, une étude au niveau de l'organe « vaisseaux » a été menée. Tous les trois mois, une acquisition en tomographie par cohérence optique de toute la longueur de l'aorte (de la crosse aortique à la bifurcation iliaque) a été réalisée sur une partie des animaux contrôles et traités. Les animaux étaient ensuite euthanasiés et les portions d'aorte prélevées pour être analysées en microscopie optique et microscopie électronique à balayage. Une véritable cartographie de toutes les plaques aortiques a alors été possible sur chaque lapin. De plus, grâce à l'excellente résolution de l'OCT, des mesures dans les trois dimensions de chaque plaque, de l'épaisseur du noyau lipidique et de la chape fibreuse ont pu être réalisées. L'histologie et l'OCT ont été corrélés pour établir une classification de la sévérité des plaques.

Dans un **second chapitre**, l'effet de la faible dose d'atorvastatine a été exploré sur le système cardio-vasculaire à l'échelle de l'organisme. Cette étape avait pour objectif d'évaluer les modifications structurales et/ou fonctionnelles induites au cours du temps par le développement de l'athérosclérose chez notre modèle animal. En effet, athérosclérose et vieillissement peuvent induire des modifications de

l'élasticité des vaisseaux. Afin d'évaluer la rigidité vasculaire et l'effet de l'atorvastatine sur cette dernière, la vitesse de l'onde de pouls a été mesurée tous les mois chez l'animal vigile. Ces mesures ont été complétées par des mesures de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque. De plus, la vasomotricité (anneaux vasculaires isolés) de plusieurs territoires vasculaires a été étudiée afin d'appréhender certains effets fonctionnels de la pathologie et du traitement utilisé dans ce travail. Les mesures de l'élasticité artérielle (test en traction statique) et de la composition en collagène et élastine de la paroi aortique (analyse en microscopie biphotonique) nous ont permis d'apporter des éléments de compréhension des mécanismes impliqués au niveau structurel.

L'évolution de l'athérosclérose et donc des plaques est étroitement corrélée à des processus d'inflammation et d'adhésion posant ainsi la question de l'effet du traitement utilisé ici sur ces mécanismes. **Le chapitre trois** est consacré à l'étude de certains paramètres impliqués dans ces processus au cours du développement de l'athérosclérose et potentiellement modifiables par l'utilisation de statine. Dans le compartiment circulant, la CRP (protéine C réactive), le LDL oxydé, ICAM, VCAM, les interleukines 6 et 10 (IL6, IL10), l'interféron gamma (INF γ), MCP1, P-selectine, le facteur tissulaire (TF), le TNF α ont été quantifiés. Parallèlement, au niveau des plaques, les macrophages ont été marqués en immunohistochimie à tous les stades de sévérité de ces dernières.

Enfin dans **le quatrième chapitre**, nous nous sommes intéressés à un autre élément du système cardiovasculaire, le cœur, et plus particulièrement le muscle cardiaque. En effet, dans l'optique d'une évaluation des éventuels effets

cardioprotecteurs du traitement par statine, les capacités oxydatives cardiaques ont été testées sur fibres perméabilisées, en conditions basale et maximale. La susceptibilité aux ROS a également été appréhendée. Ce travail est complété par le dosage de l'activité de certaines enzymes antioxydantes et d'un marqueur de la peroxydation lipidique.

CHAPITRE 1 :
Evolution de l'athérosclérose :
Suivi par Tomographie en Cohérence
Optique

1. INTRODUCTION

Il a été démontré chez l'humain qu'à dose hypocholestérolémiante, l'atorvastatine réduit la progression de l'athérosclérose [Nissen *et al.*, 2004]. En revanche, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à l'effet de faibles doses d'atorvastatine sur l'évolution de l'athérosclérose. Afin d'apporter des éléments de réponse, une méthode de détection systématique des plaques, avec une résolution permettant de visualiser les différents éléments de la plaque athéromateuse a été choisie.

Il existe plusieurs méthodes d'imagerie médicale capables de visualiser, avec plus ou moins de précisions, les plaques d'athérome. Les méthodes non invasives comme l'IRM ou le scanner vont donner des images anatomiques mais surtout fonctionnelles souvent associées à la détection d'agents de contraste. Dans cette étude, une méthode de visualisation de la structure tridimensionnelle physique fine des plaques étant nécessaire, la résolution de l'IRM et du scanner ne nous est pas apparue appropriée en particulier, pour la visualisation d'éléments fins comme la chape fibreuse. Les autres méthodes non invasives comme l'échographie ont également une résolution insuffisante. Parmi les méthodes invasives, l'angiographie est la technique de référence en clinique. Elle ne nous renseigne cependant que sur la lumière vasculaire (sténose) et non sur les caractéristiques des plaques. En recherche, l'ultrason intravasculaire (IVUS) représente une méthode particulièrement appropriée pour l'analyse de petits éléments comme les plaques d'athérome. Sa résolution ne peut cependant rivaliser avec celle de L'OCT, qui reste la technique d'imagerie *in vivo* la plus précise [Jang *et al.*, 2002 ; Van Soest *et al.*, 2010 ; Kubo *et*

al., 2014]. C'est donc cette dernière technique que nous avons choisi d'utiliser dans cette étude.

L'OCT est une technique d'imagerie utilisant une fibre optique (glissée dans un cathéter) qui émet une lumière dans le proche infrarouge (830-1250 nm) pour produire des images en coupe transversales des artères dans lesquelles il est inséré (Figure12).

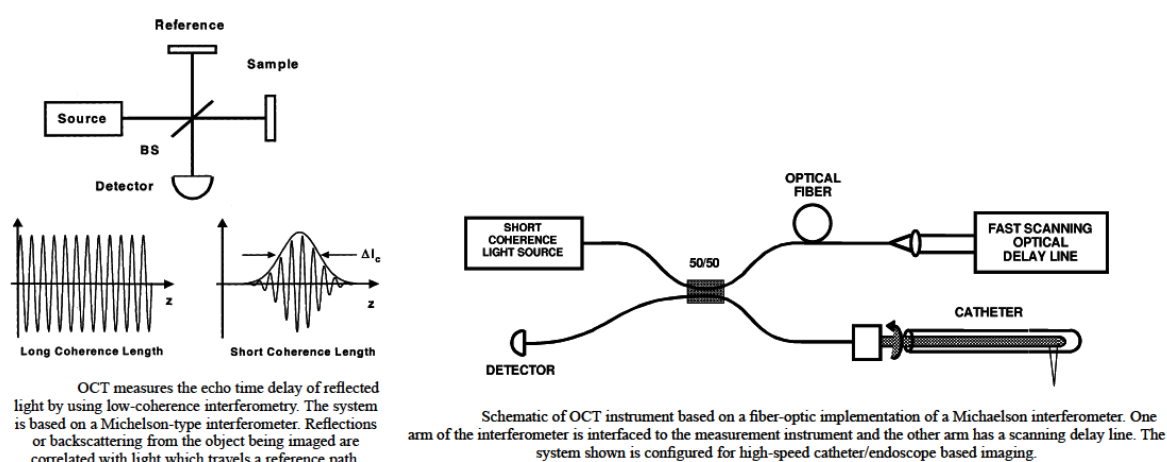


Figure 12 : Principe de fonctionnement de l'OCT (Fujimoto, 2001).

Le temps de retard de l'écho et l'intensité de la lumière réfléchi ou diffusée en retour par les tissus rencontrés sont mesurés [Huang *et al.*, 1991]. Il existe deux types d'OCT, le premier est basé sur la durée et le second sur la fréquence du signal lumineux capté en retour [Podoleanu, 2012], celui basé sur la durée étant celui utilisé dans les formes commercialisées pour la médecine. L'OCT est particulièrement adapté en médecine pour visualiser les artères [Brezinski *et al.*, 1996]. L'insertion de la fibre optique se fait alors grâce à un guide qui est retiré avant l'acquisition. Aux longueurs d'onde utilisées en OCT, la lumière est absorbée par les globules rouges ; la mesure nécessite donc un environnement exempt de sang [Huang *et al.*, 1991 ;

Lopez *et al.*, 2014]. Ceci va être possible grâce à l'injection d'un bolus d'agent de contraste juste avant l'acquisition. L'intérêt de cette méthode est sa résolution (10-20µm) qui est dix fois supérieure à celle de l'IVUS.

Il est intéressant de noter que l'OCT peut être utilisé dans l'observation et la caractérisation des plaques d'athérome [Yabushita *et al.*, 2002]. Différents types de plaques peuvent ainsi être identifiées grâce à la caractérisation de certains éléments constitutifs (Tableau 6). La sévérité des lésions athéromateuses peut ainsi être appréhendée à différents niveaux et leur possible évolution envisagée (Figure 13).

Histology	OCT findings
Intima	Signal-rich layer near lumen
Media	Signal-poor layer in middle of artery wall
Adventitia	Signal-rich outer layer of artery wall
Fibrous	Signal-rich, homogeneous region
Calcification	Signal-poor, well-delineated region
Lipid	Signal-poor, poorly delineated region
Fibrous-cap	Signal-rich layer overlying signal-poor region
Plaque rupture	Fibrous-cap discontinuity and a cavity formation
Erosion	Irregular luminal surface with thrombi
Calcified nodule	Protruding nodular calcification with thrombi
Thin cap fibroatheroma	Lipidic plaque with fibrous cap of <65 µm thick
Red thrombus	High-backscattering protrusion with signal-free shadowing
White thrombus	Low-backscattering protrusion
Vasa vasorum	Signal-poor, well-delineated void within plaque
Macrophages	Signal-rich, distinct or confluent punctuate regions with shadowing

Tableau 6 : Critères de caractérisation de la plaque d'athérome en OCT (Kubo *et al.*, 2014).

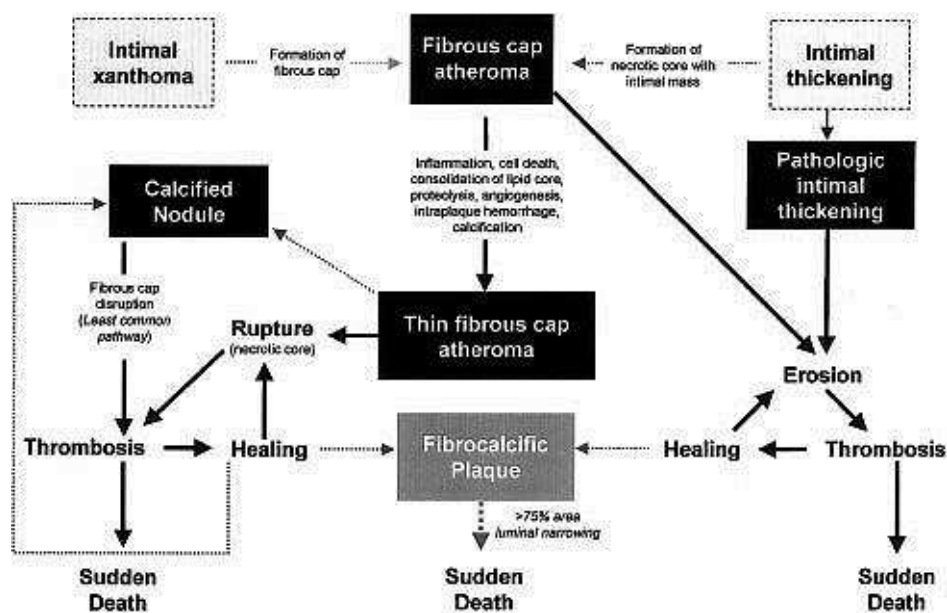


Figure 13 : Classification des lésions athéromateuses établie à partir des recommandations de l' AHA (Virmani et al., 2000).

A titre d'exemple, le caractère instable de la plaque peut être déterminé par l'épaisseur de l'intima. Hormis l'OCT, les méthodes d'imageries *in vivo* disponibles n'ont pas la résolution suffisante pour permettre cette dernière. Partant du principe que le risque de rupture est d'autant plus grand que la chape fibreuse est fine par rapport à la taille du noyau lipidique qu'elle maintient dans la paroi vasculaire, un autre indicateur peut alors être utilisé, l'épaisseur intima-média. En effet plus cet élément sera important plus la taille du noyau lipidique le sera et la chape sera proportionnellement plus fine. Une épaisseur intima-média importante est donc un indicateur de risque d'évènement cardiovasculaire aigu [Bots *et al.*, 1997 ; Lorenz *et al.*, 2007]. La mesure de l'épaisseur intima-media est également un critère de choix pour la mesure des lésions athéromateuses dans leurs premiers stades de développement, lorsque le noyau lipidique n'est pas encore constitué et que l'on ne peut donc pas encore parler de chape fibreuse. Cette épaisseur est mesurée de façon plus précise grâce à l'OCT mais surtout, cette technique permet d'identifier

l'intima et de le mesurer [Kume *et al.*, 2005 ; Kume *et al.*, 2006(a)]. On peut donc mettre en place un nouvel indicateur de sévérité, l'épaisseur de l'intima. Il apparaît que chez l'humain, une chape fibreuse fine, (en anglais « thin fibrous cap »), c'est-à-dire inférieure à 65µm, est associée à un fort risque de rupture [Burke *et al.*, 1997 ; Virmani *et al.*, 2000].

L'OCT permet également de visualiser les altérations de la plaque, même si certains critères d'altération peuvent être soumis à controverse, puisque non validés [Prati *et al.*, 2010, Kubo *et al.*, 2014]. Ces altérations pourraient cependant conduire à une plaque instable ou un accident cardiovasculaire aigu. L'OCT permet de visualiser l'érosion des plaques (surface luminale de la plaque irrégulière, thrombus) [Kubo *et al.*, 2007]. Elle est retrouvée dans 31% des patients présentant un syndrome coronarien aigu [Jia *et al.*, 2013]. Cette technique d'imagerie permet également d'observer les calcifications (présence d'une accumulation de calcium sous forme de nodules à la surface des plaques) [Jia *et al.*, 2013]. Erosion et nodules calcaires favorisent l'adhésion plaquettaire à la paroi vasculaire, conduisant à la polymérisation de fibrine et la formation d'un thrombus. Ce dernier est la principale cause d'un syndrome coronarien aigu et peut être détecté en OCT [Kume *et al.*, 2006(b)].

Par ailleurs, dans les plaques d'athérome, une néovascularisation se crée depuis l'adventice et progresse dans la lésion, l'alimentant en cholestérol et macrophages. Ces néovaisseaux peuvent être à l'origine d'hémorragies qui déstabilisent la plaque [Carlier *et al.*, 2005]. Ils apparaissent à l'OCT comme des micro-canaux et peuvent être un indice de vulnérabilité [Kitabata *et al.*, 2010]. D'autres éléments pouvant introduire de l'instabilité pourraient également être

identifiés en OCT, comme la présence de macrophages [Tearney *et al.*, 2003 ; MacNeill *et al.*, 2004].

L'OCT permet de visualiser les ruptures de plaque chez l'humain. Elles se caractérisent par une discontinuité de la chape fibreuse et la formation d'une cavité à l'intérieur de la plaque [Kubo *et al.*, 2014]. Bien qu'invasive, cette technique est répétable et permet donc de suivre l'évolution vasculaire dans un contexte de rupture de plaque [Di Vito *et al.*, 2013]. Elle apparaît comme une technique sûre qui n'induit pas de complications majeures pour les patients [Prati *et al.*, 2007].

Si cette méthode d'imagerie invasive possède de nombreux avantages, et en particulier, son importante résolution, elle présente un certain nombre de limites. Ainsi, la pénétrance de la lumière infrarouge peut être un facteur limitant (Figure 14).

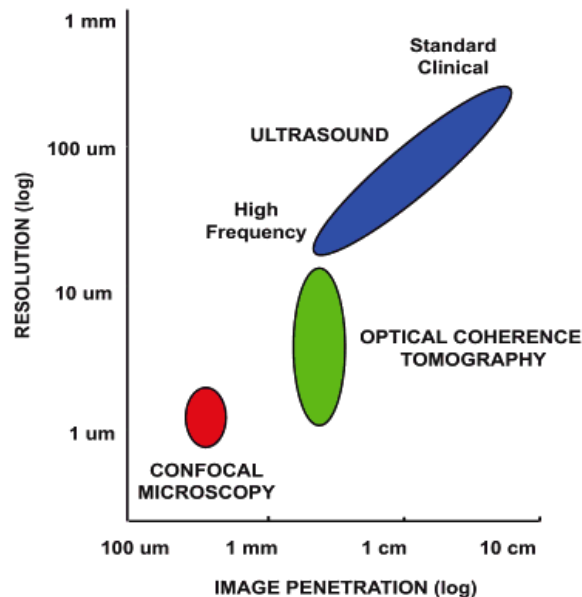


Figure 14 : Résolution et profondeur des techniques de microscopie confocale, OCT et ultrason (Fujimoto & Drexler, 2008).

En ce qui concerne la détection des plaques d'athérome, chez l'humain, il est possible que la profondeur d'acquisition soit insuffisante pour visualiser l'ensemble des plaques les plus volumineuses en particulier à cause de l'atténuation du signal par les lipides. Pour avoir une indication sur la taille du corps lipidique quand celui-ci est trop imposant pour être visualisé intégralement, le paramètre de la courbure du corps lipidique permet d'approximer sa taille par une méthode semi-quantitative [Prati *et al.*, 2010]. Chez les modèles animaux de petite et moyenne taille, ce problème est plus rarement rencontré car les vaisseaux ainsi que les plaques qu'ils comportent sont de dimension moindre.

Au cours de notre étude, afin d'étudier l'évolution de l'athérosclérose, l'OCT a donc été utilisé pour visualiser, quantifier et analyser les plaques d'athéromes développés par le lapin Watanabe. Les analyses ont été effectuées sur le groupe contrôle et sur les animaux traités à l'atorvastatine à raison de 2.5mg/Kg/jour. Les concentrations sériques en cholestérol, ASAT et ALAT ont été quantifiées. Au vu du faible nombre d'études ayant été réalisées sur ce modèle avec cette technique d'imagerie [Imanishi *et al.*, 2008(a) ; Imanishi *et al.*, 2008(b); Oh *et al.*, 2008; Popescu *et al.*, 2010], il a été nécessaire de vérifier la cohérence des images de plaques obtenues en OCT avec des coupes histologiques. L'intégralité des aortes des lapins a donc été analysée et les dimensions de chaque plaque relevées (longueur, largeur, épaisseur et volume de la plaque et du corps lipidique lorsqu'il est présent, épaisseur de la chape fibreuse) ainsi que leur position. Après cette analyse systématique des plaques, une classification en fonction de la sévérité a été établie et corrélée avec des coupes en histologie classique (coloration trichrome de Masson) et en microscopie électronique à balayage. Des coupes supplémentaires avec un

marquage des macrophages ont été réalisées sur les plaques semblant présenter une rupture. Le protocole détaillé ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans **l'article 1.**

ARTICLE 1

Early and very-low-dose atorvastatin treatment limits atherosclerotic plaque severity and rupture in WHHL: Optical Coherence Tomography (OCT) and histological findings.

Florine Tissier⁽¹⁾, Romain Didier^(1,2), MD ; Jacky Lautridou⁽¹⁾, Jacques Boschat⁽²⁾, MD ; Jean-Claude Desfontis⁽³⁾, PhD ; Yassine Mallem⁽³⁾, PhD ; Jacques Mansourati^(1,2), MD ; Karine Pichavant-Rafini⁽¹⁾, PhD ; Emmanuelle Plee-Gautier⁽⁴⁾, PhD ; Michael Theron⁽¹⁾, PhD ; Martine Gilard^(1,2), MD.

Affiliations

⁽¹⁾ EA4324 ORPHY, University of Bretagne Occidentale, Brest, France

⁽²⁾ Department of Cardiology, University Hospital of Brest, Brest, France

⁽³⁾ LUNAM University, Oniris, UPSP5304 of Animal Pathophysiology and Functional Pharmacology, Nantes, France

⁽⁴⁾ Department of Biochemistry and pharmacotoxicology, University Hospital of Brest, Brest, France

ABSTRACT

Objective

The development of primary prevention of cardiovascular disease raised the question of the use of statins at long-term knowing their potential adverse effects. Thus, our aim was to evaluate the long-term effect of a non-hypocholesterolemic dose of atorvastatin (without adverse effects) on plaque evolution in Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits.

Methods and results

An atorvastatin treatment (2.5 mg/kg/day) was tested against controls on 34 male 3 to 12 month-old rabbits. Blood total cholesterol and transaminase concentrations were measured monthly. Plaque dimensions and locations were determined using optical coherence tomography (OCT). Plaques were ranked for severity based on OCT and histological examination.

A small and transient hypocholesterolemic effect without major impact on transaminases was observed. Plaques were initially located at aortic

bifurcations and subsequently developed in other areas. This progression was limited in the treatment group. Treatment reduced plaque severity at 6 months and plaque rupture rate at 12 months.

Conclusion

Treatment by low-dose atorvastatin limited onset, development and rupture of atherosclerotic plaques. These effects seemed to be independent of lowered lipid levels and generated no major adverse effects at the dose and duration tested.

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are the worldwide leading cause of death and are generally associated with the presence of atherosclerosis [Taylor et al., 2013]. Atherosclerotic plaques progressing throughout life can lead to vulnerable plaques and rupture, causing myocardial infarction and strokes. In order to limit these acute cardiovascular events, hypocholesterolemic treatments are used and in particular, HMG-coA reductases. Among statins, the most prescribed is Atorvastatin [Jackevicius et al., 2012]. This molecule is given at doses which reduces circulating cholesterol concentrations and in particular, LDL cholesterol [Nawrocki et al., 1995]. Previous studies have shown that atorvastatin reduces atherosclerosis progression when used at hypo-cholesterolemic doses in humans [Nissen et al., 2004]. However, some adverse events have been reported, such as rhabdomyolysis [Omar et Wilson, 2002], hepatic toxicity [Schwartz et al., 2001] or increased risk of type-2 diabetes [Sattar et Taskinen, 2012].

Thus, statins must be used with care and, in a case of primary prevention, which requires long-term treatments, the possibility of doses reduction must be considered.

The present study aimed to evaluate the effect of early and low-dose atorvastatin treatment on atherosclerotic plaque evolution in an animal model, the Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit. This validated model of heritable hypercholesterolemia spontaneously develops atherosclerotic plaques similar to those present in humans [Buja et al., 1983; Shiomi and Ito, 2009]. Atherosclerosis progression was monitored by optical coherence tomography (OCT) in 3 to 12 month-old animals with versus without atorvastatin treatment. With its high resolution [Kubo et al., 2014], parameters such as the dimensions of the plaque, fibrous cap or lipid core could be measured. Since only a few numbers of studies have been carried out on animal models using OCT, histological ascertainment was performed. Plaques were ranked according to severity, and their distribution along the aorta was analyzed. A macrophage staining was performed on plaques which seemed to be in rupture configuration. Throughout the study, total circulating cholesterol, ALAT (Alanine Amino Transferase) and ASAT (Aspartate Amino Transferase) concentrations were measured monthly.

METHODS

1. Animals

The study was performed in accordance with the European Council's revised guidelines on animal care for experimental and other scientific purposes. It was approved by the local animal experimentation review board (Authorization number: CEEA.2012.189). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

The experiment was performed on 34 male homozygous WHHL rabbits (3,165±489g) breed by CPA Jeanrot (45160 Olivet, France).

During the experiment, animals were kept at the veterinary school of Nantes (Oniris, France) in animal housing under a 12-hour light-dark cycle at 21°C. Food (Lapin Clapier PDC, Le Pré du Clocher, 44155 Ancenis, France) and water were given ad libitum.

2. Experimental conditions

Rabbits were randomized in two groups: control (C) and treatment (T). The treatment group received 2.5mg/kg body weight (bw)/day atorvastatin (atorvastatin calcium, PF-00079943-07, Pfizer) diluted in drinking water. Treated water was given in the first bottle of the day and, when the statin solution was drunk, fresh water was given ad libitum. The control group had fresh water ad libitum. Treatment started when the rabbits were 3 month-old. Animals were weighed every week to adjust the treatment. Three treatment durations were tested: 3, 6 and 9 months.

Each month, a blood sample was taken from each rabbit in the median artery of the ear, using a catheter (Vasofix certo 24G, B. Braun, ref 4269071) in a dry tube with gel (Vacuette 456071). Serum was removed after spontaneous coagulation and frozen in liquid nitrogen until analysis.

After thawing at room temperature, total cholesterol was measured at the end of the treatment (between 7 and 9 months of treatment). Aspartate aminotransferase (ASAT) and alanine aminotransferase (ALAT) concentrations were measured monthly by photometry using Siemens reagents on a Siemens Advia 1800 analyzer.

3. Optical coherence tomography image acquisition

Before acquisition of OCT images, rabbits were anesthetized by intramuscular injection of ketamine (100mg/kg bw) and xylazine (10mg/kg

bw). Then, a 4-french arterial catheter (Terumo®) was inserted into the right carotid and a conventional angioplasty guidewire (0.014 mm BMW, Abbott®) was introduced under radioscopic control into the carotid up to the iliac bifurcation, allowing positioning of the OCT image catheter. Rabbits were heparinized (0.5ml at 5,000 U/ml) and euthanized by intra-arterial injection of anesthetics (100 mg/kg bw ketamine; 10 mg/kg bw xylazine). 15 ml of contrast medium (meglumine and sodium ioxaglate 320 mg iodine/ml; Hexabrix 320 Guerbet) was flushed manually through the catheter at a rate of 1.5 ml/s. When a blood-free image was observed, the OCT imaging core (Terumo FastView op-16p2613) was withdrawn at a rate of 10 mm/s using stand-alone electronic control of the pull-back motor. Images were acquired from the iliac bifurcation to the aorta arch for each rabbit. The images acquired with OCT Lunawave (Terumo) were stored digitally for subsequent analysis.

4. Optical coherence tomography analysis

Both quantitative and qualitative measurements were performed manually on 890 plaques (29±6 plaques per rabbit). Vessel and plaque characteristics were measured with the Terumo software on the OCT acquisition system.

Each plaque was characterized by thickness, length and width. Lipid cores and fibrous caps were measured when possible. For volume calculation, plaques and lipid cores were considered as ellipsoids, and volumes were calculated from their thickness, length and width when available. The total lengths of the aorta and plaques were also measured, the location of each plaque along the vessel was determined.

5. Plaque ranking

Plaques were ranked on the OCT data in 5 classes according to morphology and extension in the aortic section as follows:

Class 0: no atherosclerotic lesion;

Class 1: small lesion (<20% lumen circumference), homogeneous or slightly distorted, with smooth surface and no lipid core;

Class 2: small lesion (<20% lumen circumference), heterogeneous, with lipid core;

Class 3: moderate lesion (20-50% lumen circumference), heterogeneous, with irregular surface and lipid core;

Class 4: large lesion (>50% lumen circumference), with arterial wall distortion, eroded appearance and ulceration.

6. Microscopy

Aortas, sampled after OCT acquisition, were washed in a saline solution (NaCl 137mM; KCl 5.4mM; CaCl₂ 2.5mM; Na₂HPO₄ 1.2mM; MgCl₂ 1.2mM; Hepes 20mM; D-Glucose 15mM), then placed in fixatives.

For optical microscopy, samples were fixed in Bouin's solution (Bouin Gurr® 7000.1000, VWR) for 48h and then, included in paraffin (Paraplast®PLUS) and 5µm sections was cut. A trichromatic Gabe coloration was performed for OCT ranking comparison. For macrophage staining, sections were incubated 20 min with monoclonal mouse RAM11 antibodies (Dako M063301) diluted 1:50. Next, sections were washed and incubated for 15min with polyclonal anti-mouse antibodies (Dako E035401). Sections were washed in TBS and staining was obtained using streptavidin at 1:500 (Dako P039701) for 15 min and DAB (Dako K346711) for 15min. Negative controls were performed by omitting primary monoclonal antibodies during the first incubation. Section swere examined under a confocal microscope (Zeiss LSM 780) with a x20 lens and a camera (AxioCam Mrc; Zeiss).

For scanning electronic microscopy (SEM), a 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1M cacodylate was used as fixative. After dehydration (critical point method) and metallization (with palladium chrome), the surface of the endothelium was

observed on SEM by a Hitachi S-3200N microscope.

7. Statistical analysis

Data were expressed as medians \pm IQR. Statistical tests were performed using SIGMA STATS 10 software (StatSoft). Given the small number of animals, non-parametric Kruskal-Wallis tests were used. Differences were considered as significant when $p < 0.05$.

RESULTS

1. Blood parameters

No difference between groups was observed for cholesterol concentrations; the mean plasmatic cholesterol concentration at the end of the experimental period (animals aged of 10 to 12 months) was 18.09 ± 6.91 mM. ALAT and ASAT concentrations were not modified by the treatment (Figures 1A and 1B) except for a significant increase in ASAT at 11 and 12 months in treated animals as compared to controls.

2. Optical coherence tomography findings

Thirty-four rabbits were included in this study; 1 died just after anesthesia and 2 had illegible runs due to coagulation. The data presented were obtained from the analysis of 31 rabbits (890 plaques).

3. Plaque location

At 3 months, the percentage of thoracic plaques was $74 \pm 13\%$ and no significant change in the relative percentage of abdominal and thoracic plaques was observed. In contrast, at the beginning of the experiment (3 months), most plaques were located at bifurcations; this

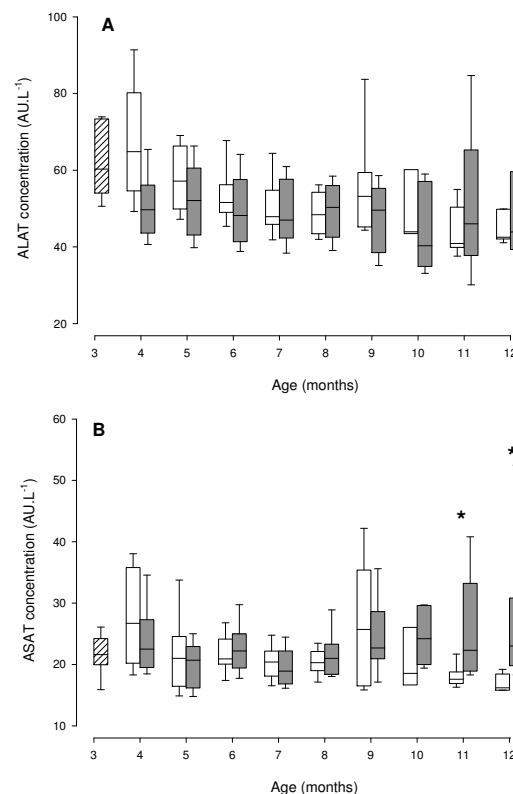


Figure 1. Cholesterol (A), ALAT (B) and ASAT (C) concentrations over time for control \square and treatment \blacksquare groups. ▨ : Reference values. Medians \pm IQR. *: significant difference between groups ($p < 0.05$).

percentage tended to decrease. This trend was significant only in the control group, whereas in treated animals the percentage of plaques not linked to bifurcations did not significantly increase (Figure 2).

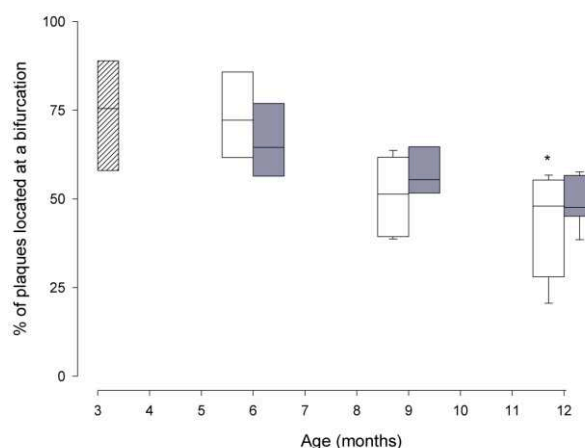


Figure 2. Percentage of plaques located at a bifurcation (A) for control \square and treatment \blacksquare groups. ▨ : Reference values. Medians \pm IQR. *: significant difference with time for control group ($p < 0.05$).

4. Quantitative parameters

The total aorta length at 3 months was 191.85 ± 26.55 mm. Despite aging, no significant evolution in total aorta length was observed. Plaque number increased in both treated and non-treated rabbits, without significant difference between groups (figure 3A). Around 50% of non-treated rabbit plaques exhibited lipid cores at 3 months, increasing to 70% at 6 and 9 months and falling below 40% at 12 months (Figure 3B). In the treatment group, at 6 months, only 50% of plaques exhibited a lipid core, increasing to 70% at 9 months and remaining constant until 12 months.

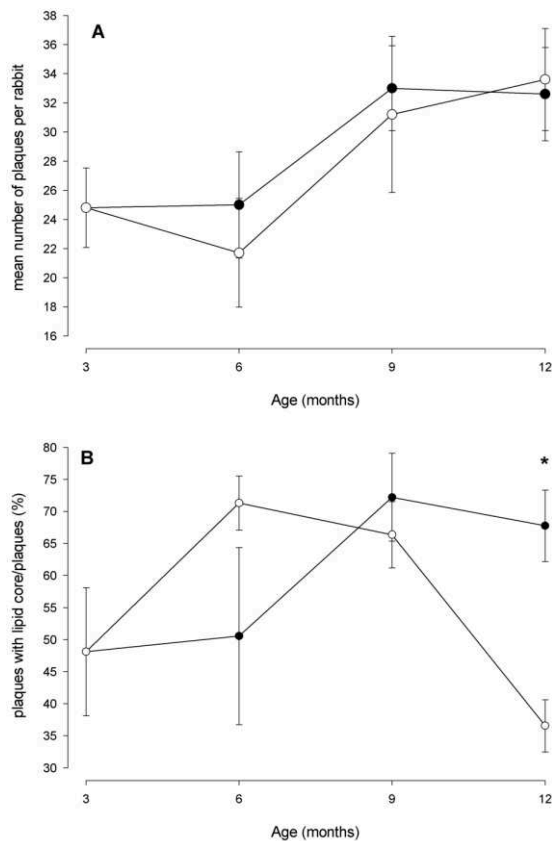


Figure 3. Mean number of plaques per rabbit (3A) and percentage of plaques with measurable lipid core (3B) per rabbit in control (○) and treatment (●) groups. *: significant difference between the two groups ($p < 0.05$).

Length, width and thickness were measured on each plaque and on the lipid core when possible. Fibrous cap thickness was determined and plaque volume was calculated (Table 1). A significant increase in lipid core width and thickness was

observed at 6 months in the treatment group as compared to controls. A significant increase in plaque thickness was observed at 12 months only in the control group. No significant difference was observed for the other parameters with group or time.

		C3 n=4	C6 n=4	T6 n=4	C9 n=5	T9 n=4	C12 n=5	T12 n=5
Length (mm)	Plaque	5.67±1.29	4.16±1.53	4.92±1.57	5.57±1.09	4.86±1.66	7.08±2.05	8.53±6.28
	Lipid Core	ND	ND	2.71±1.78	2.92±1.28	2.57±0.77	ND	3.05±2.19
Width (mm)	Plaque	1.20±0.15	1.20±0.06	0.95±0.22	1.05±0.39	1.30±0.11	1.41±0.24	1.54±0.52
	Lipid Core	0.27±0.09	0.45±0.08	0.76±0.07*	0.47±0.17	0.50±0.18	0.32±0.11	0.45±0.07
Thickness (μm)	Plaque	333±19	383±31	360±46	362±72	442±19	441±6^	386±57
	Lipid Core	161±13	202±13	269±15*	200±55	239±19	208±49	204±25
	Fibrous cap	110±445	75±14	54±8	79±12	60±12	90±12	80±3
	Volume (mm ³)	1.45±1.00	1.46±1.28	1.04±1.20	1.11±0.45	3.00±0.85	5.20±2.68	4.41±3.58

Table 1. Length (mm), width (mm) and thickness (μm) of plaques and lipid cores for control (C) and treatment (T) groups. Medians± IQR. *: significant difference between treatment and control group at a given sampling date ($p < 0.05$). ^: significant difference with time within one group ($p < 0.05$). ND: Not determined.

5. Optical coherence tomography ranking

The 890 plaques were distributed into 4 classes. Each class was significantly different from the others on the basis of quantitative parameters (Table 2). OCT ranking was checked with histology. Figure 4 depicted representative OCT images for each class compared with the corresponding histological images. In class 1, bulges appeared in the lumen. This remodeling corresponds to atherosclerotic plaques (P) under the endothelium (E), and was visible on SEM and OCT. For classes 2, 3 and 4, lipid cores (LC) were visible, growing with plaque thickness. Plaques progressively occupied a larger part of the internal diameter of the vessel, as seen in the SEM and OCT images. Figure 5 is an example of the correspondence obtained between OCT and histological analyses where it possible to visualize a degraded plaque with an important depression on the surface of the plaque. This

observation is confirmed in optical microscopy and RAM 11 staining demonstrates that this lesion is bordered by macrophages.

		Class 1 n=267	Class 2 n=373	Class 3 n=183	Class 4 n=67
Length (mm)	Plaque	2.60±1.80 ^a	3.30±2.25 ^b	5.40±4.90 ^c	13.85±21.30 ^d
	Lipid core	NC	1.8±1.8 ^a	3.5±3.6 ^b	5.3±4.0 ^c
Width (mm)	Plaque	0.50±0.46 ^a	0.72±0.49 ^b	1.61±1.20 ^c	3.74±2.90 ^d
	Lipid core	ND	0.32±0.28 ^a	0.51±0.48 ^b	0.69±1.16 ^c
Thickness (µm)	Plaque	290±120 ^a	360±130 ^b	480±180 ^c	600±230 ^d
	Lipid core	ND	190±90 ^a	240±140 ^b	320±160 ^c
	Fibrous cap	ND	70±40 ^a	70±50 ^a	50±30 ^b
	cap				
Volume (mm ³)	Plaque	0.20±0.37 ^a	0.48±0.78 ^b	2.20±3.56 ^c	10.54±34.84 ^d
	Lipid core	ND	0.07±0.15 ^a	0.43±0.62 ^b	0.64±3.23 ^b

Table 2. Dimensional characteristics of plaques for each class. Medians±IQR. Letters indicate a significant difference between classes for each parameter (p<0.05).

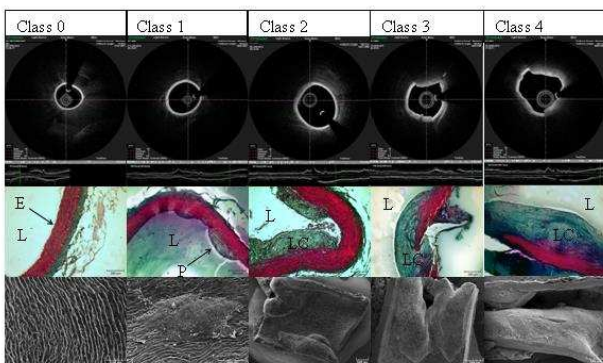


Figure 4. Class ranking in OCT (first line); Optical microscopy (second line) and Scanning Electronic Microscopy (third line) of Watanabe thoracic aortas. L: Lumen; E: Endothelium; P: Plaque; LC: Lipid Core.

The percentage of plaques per class is reported in figure 6. For classes 1, 2 and 3, neither treatment nor age had an effect. No class 4 plaques were present in control rabbits at 3 months. The percentage of class 4 plaques was significantly lower in the treatment group compared to controls at 6 months.

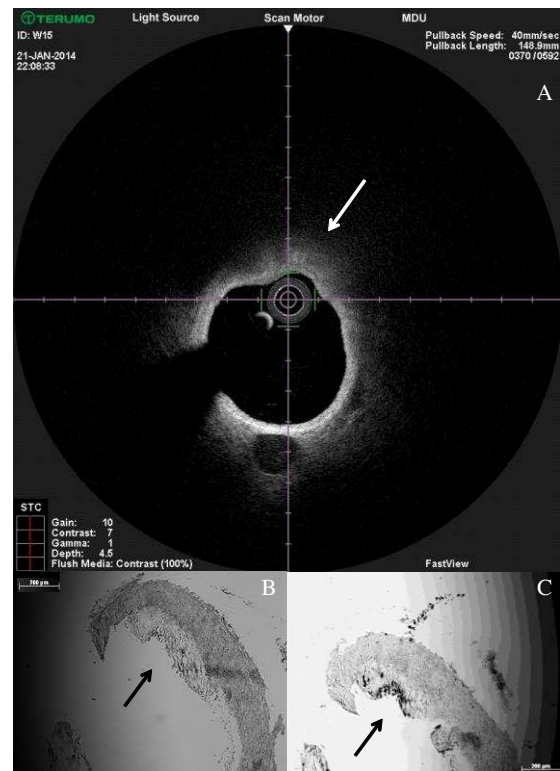


Figure 5. Observation of Watanabe atherosclerotic plaque in OCT (A), optical microscopy without first antibody staining (B) and with macrophage (RAM 11) staining (C)

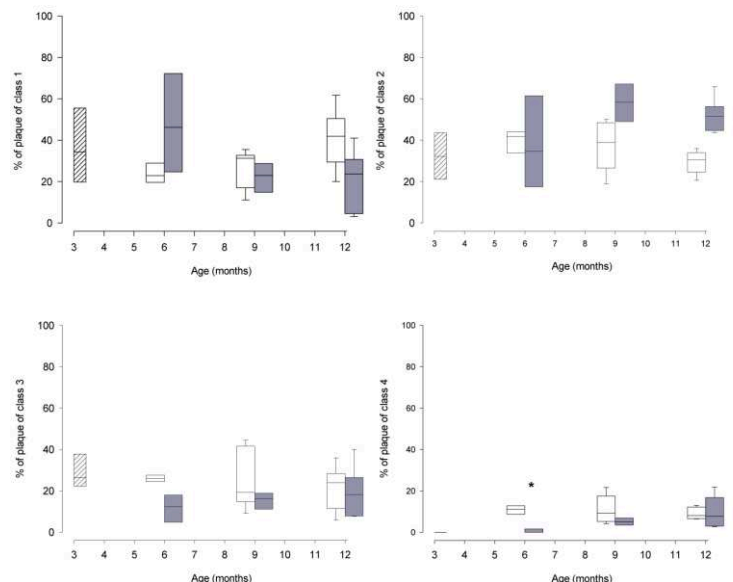


Figure 6. Percentage of plaques per class (class 1:A; class 2:B, class 3:C, class 4:D) in control , and treatment groups. : Reference values. Medians±IQR. *: significant difference between the two groups (p<0.05).

DISCUSSION

The aim of this work was to evaluate the impact of an early and very-low-dose atorvastatin treatment on plaque progression. In human, atorvastatin is given at doses adjusted to obtain a significant reduction of circulating lipids, at least 25 or 30% of reduction [Andrews et al., 2001]. In WHHL, atorvastatin decrease significantly blood cholesterol concentrations at a dose of 6mg/Kg/day [Li et al., 2014]. Here, the animals were clearly hypercholesterolemic and we used a dose of 2.5mg/Kg/day without any significant hypocholesterolemic effect. It is consequently possible to conclude that our treatment is a low dose atorvastatin treatment. In our control group, cholesterol, ALAT and ASAT concentrations were similar to those previously obtained [Tanzawa et al., 1980; Yamada et al., 2004]. With treatment, no change in ALAT concentration and only a weak increase in ASAT concentration were shown indicating the lack of major atorvastatin adverse effects.

OCT made it possible to assess treatment effects on plaques. Despite its high resolution, providing precise information on atherosclerosis [Kubo et al., 2014; Jang et al., 2002], few studies using OCT exist in WHHL [Imanishi et al., 2008(a); Imanishi et al., 2008(b); Oh et al., 2008; Popescu et al., 2010]. In order to validate OCT, histology was performed. OCT images showed good correspondence with those obtained in optical microscopy and SEM. Moreover, as observed in previous studies [Aliev et Burnstock, 1998; Shiomi et Ito, 2009] on WHHL, in our work, atherosclerosis severity increased between 3 and 12 months in the control group. The high resolution of OCT enabled all the dimensional characteristics of the plaques to be measured, along the entire aorta. This study is the first systematic OCT data collection of in situ plaque characteristics at different ages in WHHL. Systematic analysis of plaques revealed three different effects of very-low-dose atorvastatin.

The first was a change in atherosclerotic lesion location: in the youngest control animals, plaques were mainly located around the ostia of the aorta, which are zones with the strongest blood turbulence; then, over time, the whole surface of aorta was progressively colonized. In the treatment group, the number of plaques also increased, but new lesions were less prone to appear in areas without bifurcation (with more laminar blood flow). The second effect of atorvastatin was a decrease in atherosclerosis severity. Plaque severity was ranked, according to the presence or absence of lipid core, characterized by a signal-poor region [Yabushita et al., 2002] and the percentage of the internal circumference of the vessel occupied by the plaque. This second criterion is similar to the classification by quadrants [Jang et al., 2005]. Unlike studies involving plaque ranking [Yabushita et al., 2002; Jang et al., 2005], the present study do not consider fibrous cap thickness, which was impossible to determine in degraded plaques. The ranking criteria were applied to the 890 plaques. Results showed that the four classes of plaque were significantly different for each dimension. When it was possible to measure fibrous cap thickness, it was found to be thinner in the most severe class (class4), with a median value lower than 65µm.

These results indicate that the present ranking system is contributive (i) to assess plaque severity, (ii) to monitor the evolution of atherosclerosis and (iii) to determine the effect of atorvastatin treatment during a large part (about a quarter) of the rabbit life span. In 3 month-old WHHL, plaques were mainly class 1 or 2; severe plaques (class 4) were absent, and remained rare in the treatment group at 6 months, indicating that low-dose atorvastatin limited the evolution of plaque severity at the beginning of the treatment. The third effect of the low-dose atorvastatin treatment was on the number of measurable lipid cores, which was stable at

12 months in the treatment group while decreasing dramatically in the control group.

The first effect described above could be related to the first stage of atherosclerosis: endothelial dysfunction involved in plaque initiation [Davignon et Ganz, 2004]. Endothelial dysfunction is an early marker of atherosclerosis [Liao, 1998] and early atherosclerosis is known to develop in turbulent blood flow areas where unstable shear stress induces endothelial dysfunction [Chiu et Chien, 2001; Chatzizisis et al., 2007]. In WHHL, modifications of NOS or endothelin are linked with atherosclerosis initiation [Aliev et al., 2001], and statins are known to preserve endothelial function and to maintain NO^o bioavailability [John et al., 2001; Kaesemeyer et al., 1999]. In this study, a similar effect of low-dose atorvastatin could explain the reduced lesion expansion in non-turbulent areas. Atorvastatin at hypocholesterolemic doses has also been shown to reduce inflammation and endothelial adhesion [Bustos et al., 1998; Riccioni et Sblendorio, 2012], which are involved in monocyte recruitment, contributing to the first stages of atherosclerotic development, plaque maturation and lipid core formation. These phenomena could explain the change in plaque location and also the slower plaque evolution observed in the treatment group. The low-dose atorvastatin treatment may have delayed the onset of severe lesions, modifying monocyte and macrophage dynamics via elements such as M-CSF, known to be involved in monocyte recruitment during atherosclerosis development in WHHL rabbit [Inoue et al., 1992]. LDL oxidation could also be involved [Ross, 1993; Stocker et Keane, 2004], maintaining endothelial dysfunction and contributing to foam cell necrosis. Finally, the difference in number of lipid cores at 12 months could be the consequence of plaque ruptures leading to lipid core release into the blood, as

described in previous studies [Falk, 1983; Falk et al., 1995; Ge et al., 1999].

Taken together, these results indicate that, at a low dose, the atorvastatin treatment slowed down the progression of atherosclerosis. This suggests a reduced plaque rupture and lipid core release. This is in agreement with a previous human study [Otsuka et al., 2010], where pretreatment by statin at cholesterol-lowering dose reduced the rates of plaque lesions and rupture.

In conclusion, OCT is an interesting tool for the analyze of the evolution of atherosclerosis in WHHL. It allowed systematic exploration of the entire length of the aorta and an exhaustive analysis of all aortic plaques, with very high spatial resolution. It was thus possible to describe the effect of low-dose atorvastatin treatment on the development of the pathology. Three protective effects were demonstrated, without hypocholesterolemic effect: plaque initiation, evolution and rupture were delayed. It can consequently be concluded that the use of statins at low dose appears to be a particularly relevant approach in primary prevention in this crucial public health area.

REFERENCES

- Aliev G, Burnstock G. Watanabe rabbits with heritable hypercholesterolaemia: a model of atherosclerosis. *Histol Histopathol.* 1998;13:797-817
- Aliev G, Smith MA, Turmaine M, Neal ML, Zimina TV, Friedland RP, Perry G, LaManna JC, Burnstock G. Atherosclerotic lesions are associated with increased immunoreactivity for inducible nitric oxide synthase and endothelin-1 in thoracic aortic intimal cells of hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Experimental and Molecular Pathology.* 2001;71:40-54
- Andrews TC, Ballantyne CM, Hsia JA, Kramer JH. Achieving and maintaining National Cholesterol Education Program low-density

- lipoprotein cholesterol goals with five statins. *Am J Med.* 2001; 111:185-191
- Buja LM, Kita T, Goldstein JL, Watanabe Y, Brown MS. Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology.* 1983;3(1):87-101
- Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, Díaz C, Hernández G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *JACC.*1998;32:2057-2064
- Chatzizisis YS, Coskun A U, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *JACC.* 2007; 49: 2379-2393
- Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiological Reviews.* 2001; 91: 327-387
- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004; *Circulation*, 109(23 suppl 1):III27-III 32
- Falk E. Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. *Br Heart J.* 1983;50:127-134
- Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation.* 1995;92:657-671
- Ge J, Chirillo F, Schwedtmann J, Görge G, Haude M, Baumgart D, Shah V, von Birgelen C, Sack S, Boudoulas H, Erbel R. Screening of ruptured plaques in patients with coronary artery disease by intravascular ultrasound. *Heart.* 1999;81: 621-627
- Imanishi T, Kuroi A, Ikejima H, Kobayashi K, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor antagonist combination on nitric oxide bioavailability and atherosclerotic change in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Hypertens Res.*2008(a);31:575-584
- Imanishi T, Ikejima H, Tsujioka A, Kuroi A, Kobayashi K, Shiomi M, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T. Combined effects of an 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor and angiotensin II receptor antagonist on nitric oxide bioavailability and atherosclerotic change in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Hypertens Res.* 2008(b);31:1199-1208
- Inoue I, Inaba T, Motoyoshi K, Harada K, Shimano H, Kawamura M, Gotoda T, Oka T, Shiomi M, Watanabe Y, Tsukada T, Yazaki Y, Takaku F, Yamada N. Macrophage colony stimulating factor prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis.* 1992;93:245-254
- Jackevicius CA, Chou MM, Ross JS, et al. Generic atorvastatin and health care cost. *N Engl J Med.* 2011; 366:201-204
- Jang I K, Bouma B E, Kang D H, Park S J, Park S W, Seung K B, Choi KB, Shishkov M, Schlendorf K, Pomerantsev E Houser SL, Aretz T, Tearney G J. Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound. *JACC.* 2002;39:604-609
- Jang IK, Tearney GJ, MacNeill B, Takano M, Moselewski F, Iftima N, Shishkov M, Houser S, Aretz HT, Halpern EF, Bouma BE. In vivo characterization of coronary atherosclerotic plaque by use of optical coherence tomography. *Circulation.* 2005;111:1551-1555
- John S, Delles C, Jacobi J, Schlaich MP, Schneider M, Schmitz G, Schmieder RE. Rapid improvement of nitric oxide bioavailability after lipid-lowering therapy with cerivastatin within two weeks. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:1351-1358
- Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, Caldwell RW. Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 33:234-241
- Kubo T, Tanaka A, Ino Y, Kitabata H, Shiono Y, Akasaka T. Assessment of coronary atherosclerosis using optical coherence tomography. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21:1-9

- Liao JK. Endothelium and acute coronary syndromes. *Clinical Chemistry*. 1998;44:1799-1808
- Nawrocki JW, Weiss SR, Davidson MH, et al. Reduction of LDL cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15:678-682
- Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, Crowe T, Howard G, Cooper CJ, Brodie B, Grines CL, DeMaria. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004; 291:1071-1080
- Oh J, Feldman MD, Kim J, Sanghi P, Do D, Mancuso JJ, Kemp N, Cilingiroglu M, Milner T. Detection of macrophages in atherosclerotic tissue using magnetic nanoparticles and differential phase optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt*. 2008;13:054006-054006
- Otsuka F, Hibi K, Kusama I, Endo M, Kosuge M, Iwahashi N, Okuda J, Tsukahara K, Ebina T, Kojima S, Sugiyama S, Ogawa H, Umemura S, Kimura K. Impact of statin pretreatment on the incidence of plaque rupture in ST-elevation acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2010;213:505-511
- Popescu P, Flueraru C, Mao Y, Chang S, Sowa MG. Signal attenuation and box-counting fractal analysis of optical coherence tomography images of arterial tissue. *Biomed Opt Express*. 2010;1:268-277
- Riccioni G, Sblendorio V. Atherosclerosis: from biology to pharmacological treatment. *Journal of Geriatric Cardiology*. 2012;9: 305-317
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature*. 1993;362:801-809
- Shiomi M, Ito T. The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: A tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis*. 2009;207:1-7
- Stocker R, Keaney Jr J F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84:1381-1478
- Taylor F, Huffman MD, Macedo AF, et al. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;1
- Yabushita H, Bouma BE, Houser SL, Aretz HT, Jang IK, Schlendorf KH, Kauffman CR, Shishkov M, Kang DH, Halpern EF, Tearney GJ. Characterization of Human Atherosclerosis by Optical Coherence Tomography. *Circulation*. 2002;106:1640-1645

2. DISCUSSION

Le but de cette étude était de quantifier l'évolution de l'athérosclérose (en termes de nombre de plaque, de taille mais aussi de sévérité) au cours du temps et en présence d'un traitement à très faible dose d'atorvastatine chez notre modèle animal, le lapin Watanabe. L'OCT nous a permis de quantifier, localiser et classier par sévérité les plaques d'athérome de l'intégralité de l'aorte de Watanabe. Le classement proposé a été validé par les études en microscopie. On retrouve, comme précédemment décrit, une augmentation de la sévérité des plaques au cours du temps (entre l'âge de 3 et de 12 mois) [Shiomi *et Ito*, 2009 ; Aliev & Burnstock, 1998]. Nous avons pu observer également les effets du traitement avec une concentration qui n'induit ni modification majeure du cholestérol ni effets indésirables prononcés. En effet, les concentrations plasmatiques en ALAT et ASAT n'ont pas ou peu été modifiées et les concentrations chez les individus contrôles sont similaires à celles précédemment décrites chez le modèle [Tanzawa *et al.*, 1980 ; Yamada *et al.*, 2004].

Les résultats obtenus montrent que les plaques se développent initialement de façon privilégiée dans les zones de bifurcations (où le flux sanguin n'est pas laminaire), et ce en accord avec la littérature [Chiu *et Chien*, 2001 ; Chatzizisis *et al.*, 2007]. Mais notre étude fait apparaître un ralentissement de l'extension de la pathologie suite au traitement : l'envahissement des zones de l'aorte hors bifurcations est moins rapide chez les animaux traités que chez les contrôles. Cet effet du traitement pourrait provenir d'une action de la statine au niveau de l'endothélium. En effet, dans le cadre du développement de l'athérosclérose, il peut apparaître une dysfonction endothéliale préalable à la mise en place de lésions athéromateuses [Davignon *et Ganz*, 2004 ; Liao, 1998]. Cette dysfonction endothéliale peut être ralentie ou inhibée par un traitement à la statine, qui peut

notamment améliorer la biodisponibilité du NO [Kaesemeyer *et al.*, 1999 ; John *et al.*, 2001]. Par ailleurs, l'atorvastatine peut également réduire l'inflammation et l'adhésion à l'origine de la formation des plaques [Bustos *et al.*, 1998 ; Riccioni & Sblendorio, 2012].

Ces effets de l'atorvastatine peuvent aussi être à l'origine d'un ralentissement de l'évolution des lésions. En effet, le traitement utilisé ici réduit la sévérité des lésions. Ceci a pu être mis en évidence par l'utilisation de la classification proposée, basée sur la présence d'un noyau lipidique, d'une surface de plaque irrégulière ou du pourcentage de la circonférence interne du vaisseau occupé par la plaque (similaire à la classification par cadran de Jang *et al.*, 2005). Après l'analyse des 890 plaques en présence, une classification en cinq classes statistiquement différentes a été établie. Elle va en ordre croissant de sévérité, depuis la classe 0 (sans lésion apparente) à la classe 4 de plus grande sévérité. Sur cette dernière classe, l'épaisseur de la chape fibreuse, lorsqu'elle a pu être mesurée, est inférieure à 65 μ m. La sévérité des plaques augmente avec l'avancée en âge des lapins puisque la classe 4 n'est pas représentée chez les individus de 3 mois mais apparaît progressivement avec le temps. A 6 mois, la proportion de plaques de classe 4 chez les individus traités est statistiquement inférieure à celle observée chez les animaux contrôle. Ceci met en évidence que le traitement limite la progression de la sévérité de la pathologie, en tout cas sur les sujets les plus jeunes. Ceci pourrait traduire une action sur les premières phases de développement de la pathologie. On retrouve en effet une réduction de la sévérité moyenne des plaques à l'âge de 6 mois entre contrôles et traités. Une des hypothèses que nous pouvons avancer est une action du traitement sur l'internalisation et l'oxydation des LDL impliqués dans le développement de la pathologie [Ross, 1993 ; Stocker & Keaney, 2004]. Ces LDL, et

en particulier les LDL oxydés, sont impliqués dans les phénomènes inflammatoires de l'athérosclérose, tout comme la présence et l'adhésion des macrophages, y compris chez notre modèle [Inoue *et al.*, 1992]. Il apparaît donc comme primordial de quantifier les principaux paramètres de l'inflammation et de l'adhésion dans la suite de cette étude, d'autant plus que des ruptures de plaques ont pu être observées en histologie, et que sur ces coupes, les macrophages sont localisés préférentiellement au niveau de la zone de rupture. Ces ruptures de plaques pourraient expliquer une partie de la disparition des noyaux lipidiques chez les individus contrôle et le plus grand nombre de plaques avec encore leur noyau lipidique chez les traités par rapport aux animaux contrôles à 12 mois.

En conclusion, cette étude est, à notre connaissance, la première à quantifier et caractériser les plaques d'athérome de façon systématique sur le lapin Watanabe avec la technique d'imagerie OCT. Ces mesures nous ont permis de proposer une classification des plaques en fonction de leur sévérité, allant jusqu'à la rupture, confirmée en histologie. Elle nous a également permis de mettre en évidence des évolutions de plaques différentes en présence ou en absence du traitement. Quelles conséquences ces différences ont-elles sur le fonctionnement du système vasculaire ? Des éléments de réponse à cette question seront apportés dans le chapitre 2.

CHAPITRE 2 :
**Effets du traitement par atorvastatine
sur le système vasculaire**

1. INTRODUCTION

En plus de leur fonction de transport du sang, de porteur d'oxygène et de nutriments aux différents organes, les artères de gros calibre ont également une fonction d'amortissement [Nichols & O'Rourke, 2005]. En effet, le sang est pompé par le cœur et en sortie de ventricule gauche, il arrive de façon pulsé et à forte pression. La crosse aortique et les premiers centimètres de l'aorte doivent donc supporter de fortes variations de pression. Le rôle des artères de gros calibre est donc de transformer ce débit pulsé en débit qui sera continu au niveau des tissus (Figure 15).

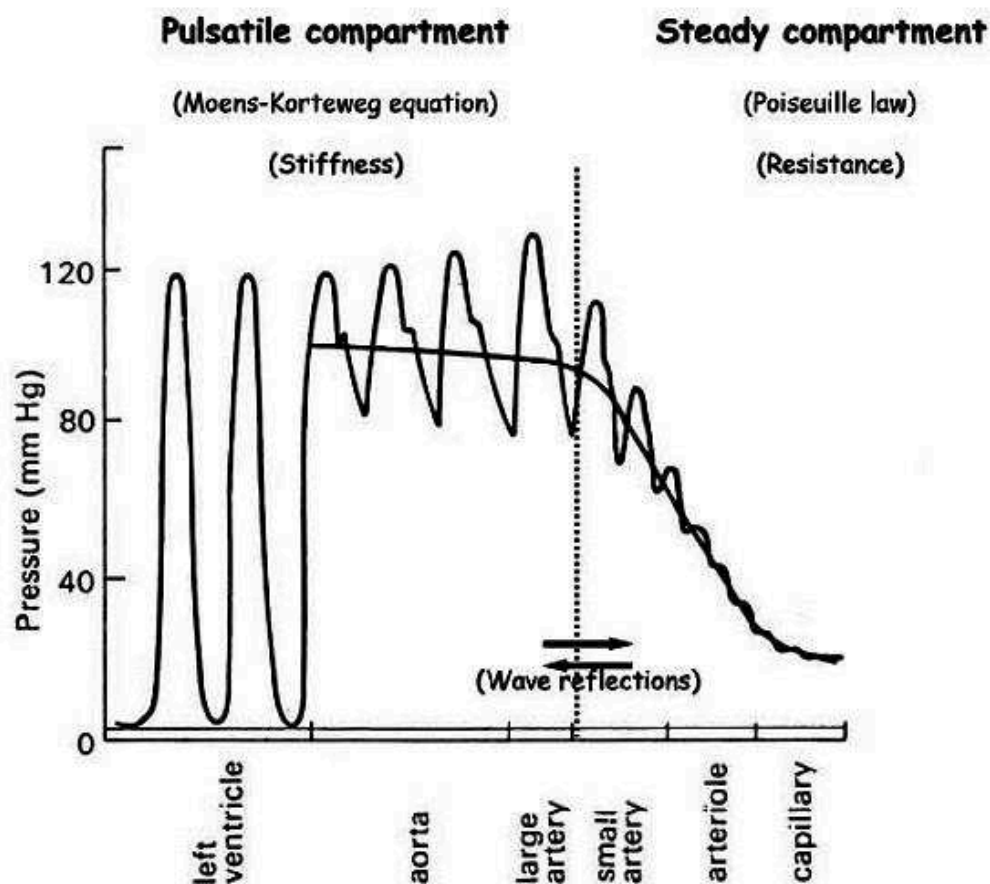


Figure 15 : Pression sanguine le long de l'arbre artériel (Safar & Boudier, 2005).

Ce phénomène d'amortissement est aussi connu sous le nom d'effet « Windkessel ». Il permet de maintenir une pression et un débit sanguin relativement élevés pendant la diastole et de transformer un débit pulsatile en flux continu [Safar et Boudier, 2005 ; Westerhof *et al.*, 2009]. L'hémodynamique du système artériel peut ainsi être décrit par le modèle de Frank Windkessel en terme de résistance (résistance à l'écoulement), compliance (distensibilité), impédance d'entrée (ensemble des facteurs qui s'opposent à l'éjection du ventricule gauche) et d'inertance (mesure de la différence de pression relative à un changement de la vitesse d'écoulement d'un fluide au cours du temps). Les artères élastiques proximales se dilatent, à chaque battement cardiaque, de 10% chez le sujet jeune alors que ce mouvement n'est que de 2 à 3% dans les artères musculaires [O'Rourke & Hashimoto, 2007]. Cette capacité repose sur la compliance artérielle. Celle-ci mesure la capacité d'une artère à emmagasiner un volume sanguin sous l'effet de la pulsabilité artérielle. La distensibilité artérielle représente alors une compliance normalisée au volume artériel non contraint [Safar, 2002]. La compliance et la distensibilité caractérisent les propriétés élastiques de l'artère et elles diminuent avec l'âge.

L'élasticité est donc une composante importante des artères, et notamment des artères de gros calibre. Avec le temps, des modifications de ces vaisseaux peuvent apparaître, et en particulier une rigidification. L'artériosclérose, souvent confondue avec l'athérosclérose (Tableau 7), est une pathologie dégénérative qui touche la paroi artérielle. Elle représente une rigidification vasculaire et un épaissement progressif de l'intima-média des artères de toutes tailles avec l'avancée en âge (vieillesse des artères) [Nagai *et al.*, 1998]. L'épaississement de la média repose sur une hypertrophie des cellules musculaires lisses et l'accumulation de fibronectine

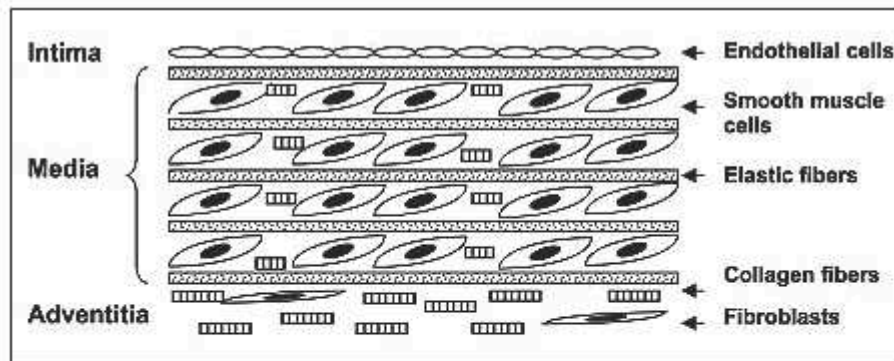
et de collagène, directement en lien avec la formation des AGE (Advanced-glycosylation end products) [Jacob,2006].

	Athérosclérose	Artériosclérose	
Localisation	Grosses et moyennes artères (préférentiellement au niveau des coudes, bifurcations, rétrécissements...)	Toutes artères	
Types de lésions	Focales	Etendues	
Couche histologique principalement concernée	Intima	Média	
Impact sur le diamètre artériel	Diminution (sténose)	Grosses artères Dilatation	Artérioles Sténose
Répercussion de la pathologie	En aval de la lésion	En amont des lésions	En aval de la lésion
Manifestation clinique	Ischémie tissulaire	Insuffisance cardiaque	Ischémie tissulaire
Exploration	Biologie (profil lipidique, inflammation) Imagerie	Exploration fonctionnelle (imagerie)	
Base de la calcification	Noyau lipidique	Produits de dégradation de la MEC	
Mécanismes physiopathologiques principaux	Dépôt lipidique Inflammation Dysfonction endothéliale Remodelage matriciel Calcification	Anomalie de la vasorégulation endothéliale Remodelage matriciel Calcification	

Tableau 7 : Principales différences entre athérosclérose et artériosclérose (Cottart et al., 2009).

L'artériosclérose se décompose en trois étapes qui sont : le dysfonctionnement de l'endothélium, le remodelage de la matrice extracellulaire pariétale et enfin la calcification de la média (médiacalcosse). Elle peut s'accompagner d'athérosclérose (dans les artères élastiques notamment) qui contribue au dysfonctionnement endothélial et à la rigidification des artères par le développement de plaques complexes au niveau de l'intima. Ces plaques peuvent présenter des calcifications, des noyaux lipidiques instables ou créer une sténose qui vont modifier l'élasticité artérielle et les résistances à l'écoulement. Dans ce contexte pathologique, l'épaisseur intima-média, tout comme la rigidité artérielle, sont des biomarqueurs permettant d'identifier des patients vulnérables [Vassan, 2006 ; Lakatta & Levy, 2003].

Les vaisseaux sanguins sont des tissus extensibles et cette propriété est liée aux fibres élastiques de la matrice extracellulaire (MEC). Elle se compose en effet de 4 catégories de macromolécules : l'élastine, les collagènes, les protéoglycanes et les glycoprotéines de structure [de Jaeger & Cherin, 2012]. La composition détaillée de la MEC est présentée sur la figure 16.



Structural component	Molecules	Main properties
Collagen fibers	Types I and III collagens ($\approx 90\%$) Types V, VI, VIII, XII, XIV, XV and XVIII collagens	Tensile strength
Elastic fibers	Elastin ($\approx 90\%$) Fibrillin-1 and -2, MAGP-1 et -2, Emilin-1 et -2, Fibulin-5	Elasticity
Basement membrane of endothelial cells and smooth muscle cells	Type IV collagen Laminins, Entactin Perlecan (HS-PG)	Filtration, resistance
Other components	Proteoglycans : - Versican (CS-PG), hyaluronan - Biglycan (DS-PG), decorin (DS-PG), lumican (KS-PG) (small PG) - Syndecans (HS-PG), glypican (HS-PG) (cell-associated PG)	Hydration, filtration, interactions with other ECM components, reservoir of growth factors
	Structural glycoproteins: Fibronectins, Vitronectin	Interactions between cells and other ECM molecules <i>via</i> integrins
	Matricellular proteins: Thrombospondins, SPARC, Tenascins, Osteopontin, Proteins of the CCN family	Structure, bioreactivity

Figure 16 : Composition de la matrice extracellulaire de la paroi artérielle (Jacob, 2003).

Dans le système artériel, il faut distinguer les artères élastiques de gros et moyen calibres des artères musculaires périphériques de petit calibre. Dans le cas des premières, la MEC est riche en collagène et surtout en élastine alors que les deuxièmes comprennent une plus grande proportion de cellules musculaires lisses. Les artères de gros calibre comme l'aorte sont majoritairement composées de fibres élastiques, elles-mêmes constituées à 90% d'élastine et à 10% de microfibrilles [Rosenbloom *et al.*, 1993]. Aux faibles pressions, les fibres élastiques ont un rôle majeur dans la résistance mécanique des vaisseaux alors que la résistance artérielle aux pressions élevées est assurée par les fibres de collagène en lien avec leur diamètre et leur orientation [Ottani *et al.*, 2001]. En effet, les fibres d'élastine sont capables d'une distension de plus de 100% contrairement aux fibres de collagène qui ne sont étirables que de 3 à 4% [de Jaeger & Cherin, 2012]. Les lamelles élastiques sont responsables du lisage de la pression en sortie de ventricule gauche [Fhayli *et al.*, 2012]. Avec l'âge et sous la contrainte pulsatile, elles peuvent se dégrader, se fragmenter, se calcifier et entraîner le développement d'une fibrose [de Jaeger & Cherin, 2012].

Les fibres élastiques sont synthétisées pendant le développement et se renouvellent ensuite de façon extrêmement lente (plusieurs années) [Vrhovski & Weiss, 1998 ; Jacob, 2006]. Elles peuvent, par contre, être dégradées par des élastases comme les sérines protéases [Kielty *et al.*, 1994] ou des métalloprotéases matricielles [Ashworth *et al.*, 1999]. On observe donc une diminution de la proportion relative en élastine au cours du temps [de Jaeger & Cherin, 2012]. La perte d'élasticité due à ces dégradations constitue un facteur majeur dans le vieillissement des tissus connectifs. L'impact d'une désorganisation des composants des fibres élastiques peut être observé dans le cadre de mutations génétiques à ce niveau. Le

syndrome de Marfan (mutation de la fibrillin-1) conduit à une attaque de la média par fragmentation des fibres élastiques et mort des CML ainsi qu'une insuffisance mitrale [Weyman & Scherrer-Crosbie, 2004]. Le syndrome de Beals (ou Congenital Contractural Arachnodactyly) repose sur une mutation de la Fibrilline-2 et entraîne des malformations au niveau circulatoire et cardiaque [Lipson *et al.*, 1974]. Les mutations sur l'élastine peuvent quant à elles conduire au syndrome de Williams qui engendre une augmentation de l'épaisseur intima-média [Sadler *et al.*, 1998] ainsi que d'autres désordres cardiovasculaires [Scheiber *et al.*, 2006] tel qu'une sténose aortique supra- valvulaire [Tassabehji *et al.*, 1998]. Des modèles murins ont été développés pour comprendre le mécanisme de ces pathologies [Kielty *et al.*, 2002].

La mesure de l'élasticité vasculaire permet d'évaluer l'état physiologique ou pathologique des vaisseaux. De nombreuses méthodes ont été développées pour une application en clinique [Hallab *et al.*, 2012] utilisant des techniques comme la mesure de la pression, le Doppler, l'IRM, l'index de pression systolique ou encore en utilisant la relation pression/diamètre [van Gorp *et al.*, 1995]. Nous ne détaillerons ici que les deux méthodes les plus couramment utilisées à savoir la pression différentielle et la mesure de l'onde de pouls ainsi qu'une méthode physique de mesure sur tissu, utilisable en recherche, le test de traction statique.

La pression différentielle ou pression pulsée correspond à la différence entre le maximum de pression systolique et le minimum de pression diastolique. Lorsqu'il augmente, ce paramètre accroît le risque d'hypertrophie ventriculaire gauche et l'épaisseur de l'intima-media [Boutouyrie *et al.*, 2004]. Son augmentation est donc un indicateur d'un risque cardiovasculaire [Nichols & O'Rourke, 2005 ; Lakatta & Levy, 2003 ; Safar, 2002].

Le fonctionnement rythmique de la pompe cardiaque est à l'origine d'une onde de pouls qui est déterminée par (1) la contraction ventriculaire et (2) l'onde de réflexion montant de l'arbre artériel et issue des zones de changements brusques de l'écoulement comme les bifurcations. La rigidification aortique liée à l'âge peut avoir des répercussions au niveau de la pression sanguine (Figure 17).

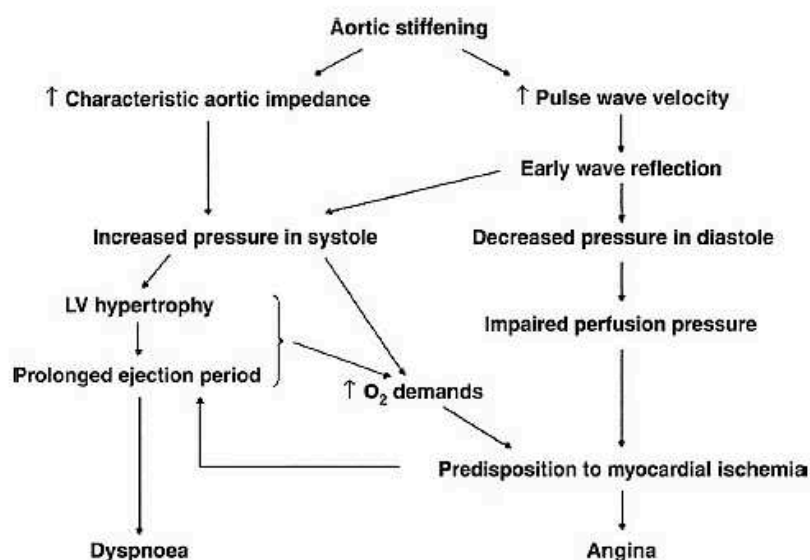


Figure 17 : Effets du vieillissement aortique (O'Rourke & Hashimoto, 2007).

En effet, l'onde de pouls se propage plus rapidement dans les vaisseaux moins élastiques et un retour plus précoce des ondes de pression réfléchies peut être observé. Celles-ci vont pouvoir se superposer aux ondes incidentes et créer une hypertension systolique [Boutouyrie & Laurent, 2004]. Le retour prématuré des ondes de réflexion peut donc conduire à une augmentation de la pression systolique centrale [Nichols, 2005 ; O'Rourke & Hashimoto, 2007 ; Duprez, 2008] et une diminution de la pression diastolique [Franklin *et al.*, 1997]. La mesure de la vitesse de l'onde de pouls (VOP) consiste à enregistrer l'onde de pouls en simultané à deux endroits du corps éloignés d'une distance connue. Le décalage temporel observé

entre les deux acquisitions rapporté à la distance parcourue permet d'établir la vitesse avec laquelle l'onde se déplace le long de l'arbre artériel ($VOP=d/dt$). Plus les artères sont rigides et plus cette vitesse est importante, la VOP est donc un indicateur de rigidité artérielle [Lehman, 1999 ; Asmar *et al.*, 1995] y compris en lien avec la présence d'athérosclérose [van Popele *et al.*, 2001]. Cette mesure simple et non invasive est validée et utilisée en clinique [Yamashina *et al.*, 2002] avec une mesure le plus souvent entre la carotide et la fémorale [Asmar *et al.*, 1995]. La mesure de la vitesse de l'onde de pouls est ainsi un marqueur validé de l'élasticité artérielle [Lakatta & Levy, 2003] et un indicateur de risque cardiovasculaire lié en particulier à l'athérosclérose [Lehman *et al.*, 1993]. En effet, le développement de l'athérosclérose va conduire à une augmentation de la vitesse de l'onde de pouls en réponse à une diminution de l'élasticité vasculaire [Farrar *et al.*, 1991 ; Newman *et al.*, 1971]. Un consensus européen recommande les deux méthodes les plus usitées pour la mesure de l'élasticité artérielle que sont la vitesse de l'onde de pouls carotide-fémorale et l'analyse de la forme de l'onde [Laurent *et al.*, 2006]. En effet, la vitesse de l'onde de pouls n'est pas la seule modification apportée par le vieillissement vasculaire et l'on observe également une modification de la forme de l'onde de pression (Figure 18). Le long des tracés obtenus au niveau aortique ou périphériques, on peut ainsi suivre les ondes relatives au cycle cardiaque et les ondes réfléchies en distalité. Sont observables, entre autre, la pression diastolique minimale (point de départ de l'onde pulsatile artérielle), l'onde de percussion ou pic de pression systolique, l'onde propagée (causée par l'éjection du ventricule gauche) et l'onde réfléchie [Nichols, 2005].

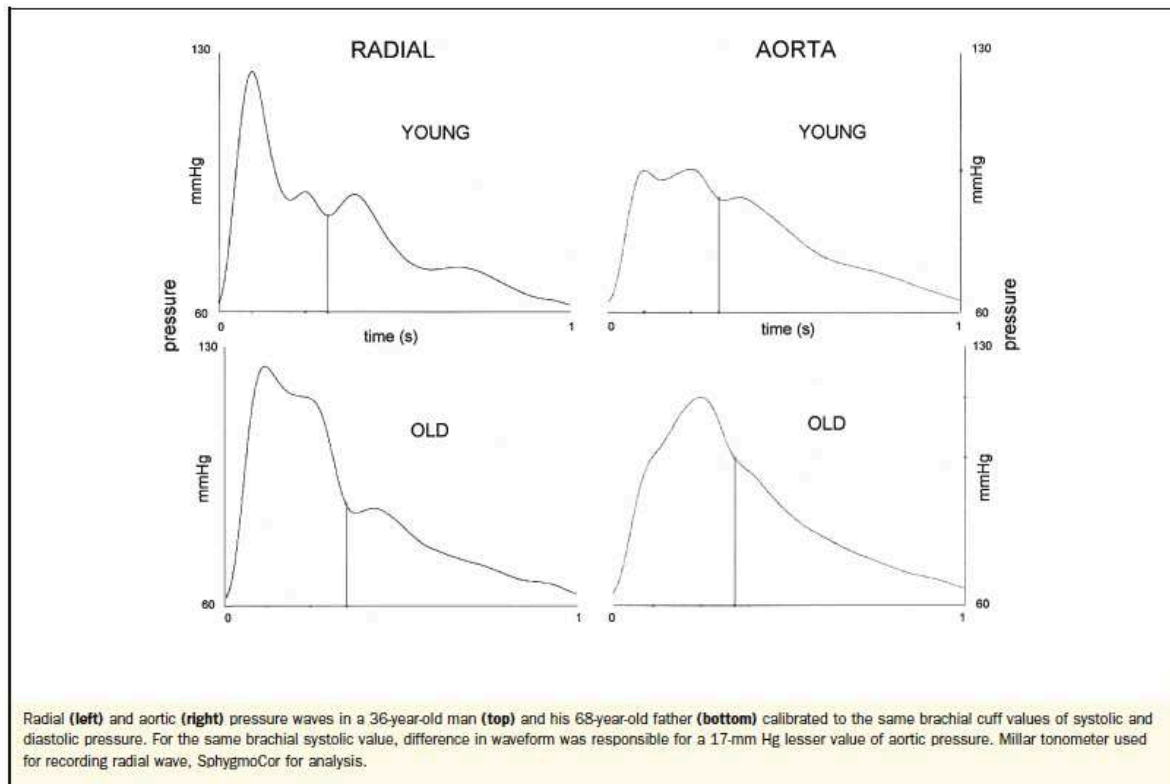
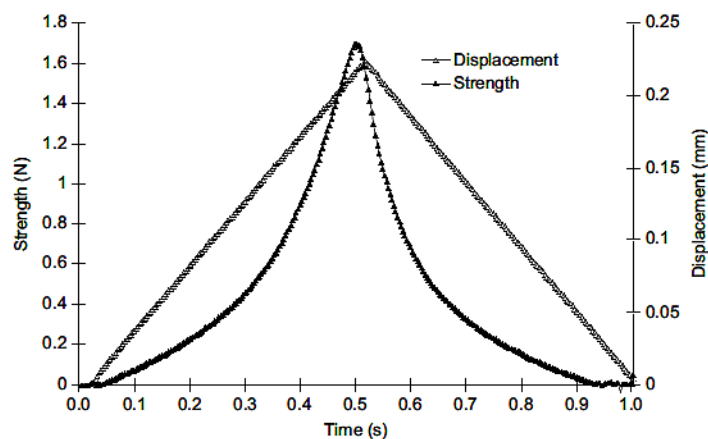


Figure 18 : Modification de l'onde de pression avec l'âge (d'après O'Rourke & Hahimoto, 2007).

Les artères, comme beaucoup de tissus biologiques, ont un comportement élastique non linéaire (corps viscoélastique non homogène et non uniforme) [Dobrynin & Carillo, 2011]. Le test de traction permet, sur l'organe isolé *in vitro*, de déterminer le module d'Young propre à chaque matériau. Le module d'Young est un module d'élasticité. En fonction de la déformation appliquée, il diffère puisque relatif aux fibres d'élastine à faible déformation et aux fibres de collagène à forte déformation [Assoul *et al.*, 2008]. Schématiquement, on peut relier la contrainte, le module d'Young et la déformation, par la loi de Hook :

$$\sigma = E\varepsilon$$

avec σ la contrainte (en unité de pression), E le module d'Young (en unité de pression) et ε l'allongement relatif ou déformation (adimensionnel). Dans le cas des échantillons biologiques, la déformation n'est pas linéaire (Figure 19) [Assoul *et al.*, 2008]. Pendant la mesure, l'échantillon est placé entre deux mors, à température contrôlée et à saturation d'eau, puis est progressivement étiré, à vitesse constante. Les mesures peuvent se faire dans le sens transversal ou longitudinal du vaisseau (avec leurs modules d'Young respectifs) [Holzapfel, 2006 ; Karimi *et al.*, 2015 ;].



Strength (left scale) and displacement (right scale) versus time for one native thoracic rat artery in longitudinal traction (frequency = 1 Hz; strain = 40%).

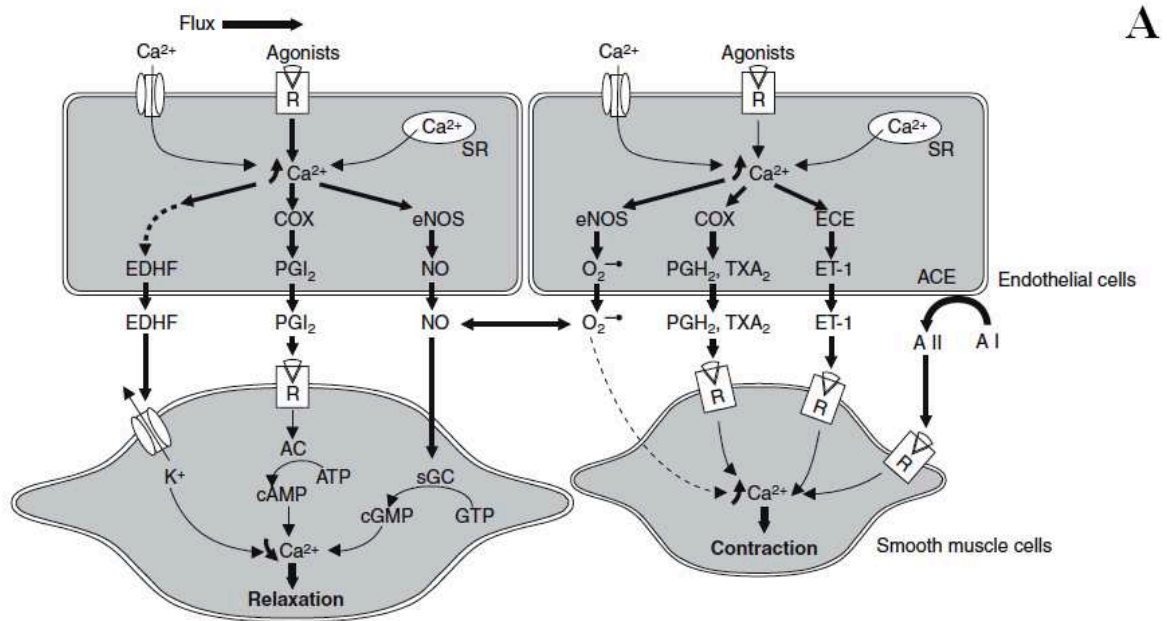
Figure 19 : Réponse à l'étirement de vaisseaux sanguins à faible déformation en test de traction statique (Assoul *et al.*, 2008).

Grâce à cette méthode, il a été mis en évidence chez l'humain que les vaisseaux présentant des lésions athéromateuses avaient une moins grande élasticité que les artères saines [Karimi *et al.*, 2015]. Un traitement par statine pourrait limiter l'évolution de ces lésions. La question est alors de savoir si ce traitement peut aussi permettre de préserver tout ou partie des propriétés élastiques des artères touchées par l'athérosclérose. Plusieurs études ont été menées en ce

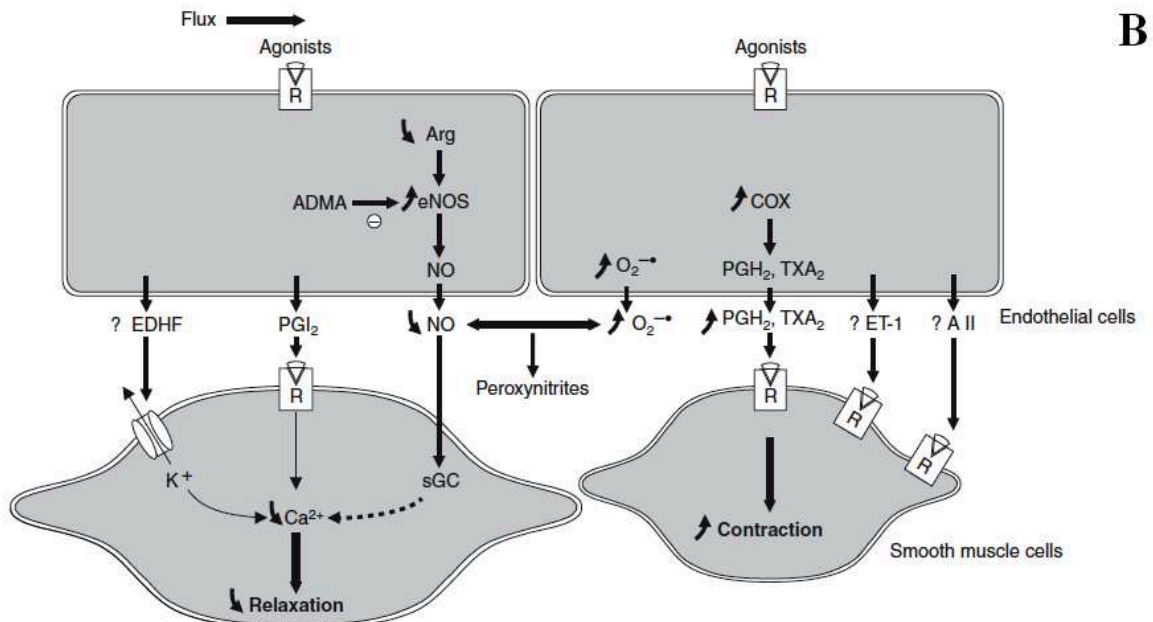
sens sans pour autant pouvoir conclure sur un effet spécifique des statines sur l'élasticité vasculaire. En effet, les résultats obtenus peuvent être contradictoires [Rizos *et al.*, 2010]. Cependant, il a été mis en évidence qu'un traitement par atorvastatine à des doses hypocholestérolémiantes pouvait conduire à une plus grande élasticité des artères [Kontopoulos *et al.*, 2003 ; Van Doornum *et al.*, 2004]. Cet effet pourrait être en lien avec l'épaisseur de l'intima-média, la composition en élastine/collagène de la paroi, les ROS et aussi avec la voie du NO (amélioration de la fonction endothéliale) [Zieman *et al.*, 2005] qui joueraient un rôle dans les résistances à l'écoulement (vasodilatation).

En effet, en dehors des paramètres structurels précédemment présentés, les vaisseaux sanguins comportent des propriétés fonctionnelles qui peuvent agir sur le diamètre vasculaire et le débit sanguin. Une dérégulation de ces phénomènes de vasoconstriction ou vasodilatation liés à une contraction ou un relâchement des muscles lisses vasculaires pourraient conduire à une modification de l'élasticité artérielle. Le niveau de contraction des cellules musculaires lisses (CML) est ainsi contrôlé par le système nerveux autonome (noradrénaline, acétylcholine) et une grande diversité de substances hormonales vaso-actives, avec des effets vasoconstricteurs (vasopressine, angiotensine II, adrénaline, sérotonine, etc) ou vasodilatateurs (acétylcholine, facteur atrial natriurétique, bradykinine, histamine, prostaglandine, etc). Ces deux voies de signalisations hormonales sont prépondérantes dans le tonus vasculaire et passent notamment par une interaction avec l'endothélium [Furchgott *et al.*, 1980]. Il est en effet au contact des hormones circulantes qui vont avoir un rôle essentiellement vasodilatateur *via* la voie du monoxyde d'azote (NO), tout comme les forces de cisaillement. Le NO, généré à partir d'arginine et d'oxygène par les NO synthases, passe par diffusion aux cellules

musculaires lisses et va activer la guanylate cyclase, induisant une production de GMPc (Guanosine monophosphate cyclique). Ce GMPc va activer les PKG (protéine kinase G) qui phosphorylent alors le phospholambane. Celui-ci favorise la recapture du Ca^{2+} et donc, *in fine*, la relaxation des CML. Une diminution de la synthèse du NO va donc avoir pour conséquence une réduction de la vaso-relaxation et donc une diminution fonctionnelle de l'élasticité vasculaire. Lors du vieillissement des artères, c'est principalement la fonction vasodilatatrice de l'endothélium (relaxation endothélium dépendante) qui est altérée (Figure 20) et ceci est couramment appelée dysfonction endothéliale [Matz & Andriantsitohaina, 2003]. Cette dysfonction endothéliale est également impliquée dans les pathologies vasculaires comme l'athérosclérose [Ross, 1999].



Release of relaxing and contracting factors from endothelial cells and their effects on vascular smooth muscle cells. **AC** = adenylyl cyclase; **ACE** = angiotensin converting enzyme; **ATP** = adenosine triphosphate; **A I** = angiotensin I; **A II** = angiotensin II; **cAMP** = cyclic adenosine monophosphate; **cGMP** = cyclic guanosine monophosphate; **COX** = cyclo-oxygenase; **ECE** = endothelin converting enzyme; **EDHF** = endothelium-derived hyperpolarising factor; **eNOS** = endothelial nitric oxide synthase; **ET-1** = endothelin-1; **GTP** = guanosine triphosphate; **NO** = nitric oxide; $O_2^{\bullet-}$ = superoxide anions; **PGH₂** = prostaglandin H₂; **PGI₂** = prostacyclin; **R** = receptor; **sGC** = soluble guanylyl cyclase; **SR** = sarcoplasmic reticulum; **TXA₂** = thromboxane A₂.



Alteration of the mechanisms involved in endothelium-dependent relaxation in the course of aging. **ADMA** = NG-NG'-asymmetric dimethyl-arginine; **Arg** = arginine; **A II** = angiotensin II; **COX** = cyclo-oxygenase; **EDHF** = endothelium-derived hyperpolarising factor; **eNOS** = endothelial nitric oxide synthase; **ET-1** = endothelin-1; **NO** = nitric oxide; $O_2^{\bullet-}$ = superoxide anions; **PGH₂** = prostaglandin H₂; **PGI₂** = prostacyclin; **R** = receptor; **sGC** = soluble guanylyl cyclase; **TXA₂** = thromboxane A₂.

Figure 20 : Vaso-contraction et vaso-relaxation endothélium-dépendant dans les artères saines (A) et leurs modifications dans le cadre du vieillissement (B) (Matz & Andriantsitohaina, 2003).

Dans le cadre de ce travail de thèse, notre objectif est d'évaluer les effets d'un traitement à faible dose d'atorvastatine sur certains paramètres du système cardiovasculaire potentiellement affectés par l'athérosclérose. Dans ce chapitre, nous nous sommes en particulier intéressés à l'élasticité des artères de gros calibres. Ce paramètre très intégrateur est finalement le reflet de la fonction d'amortissement des artères, cette dernière dépendant entre autre de leur capacité à se déformer en fonction des besoins physiologiques. L'élasticité des artères est évaluée *in vivo* par la mesure de l'onde de pouls. *In vitro*, des expérimentations ont été réalisées afin d'identifier les principaux facteurs responsables de cette élasticité, à savoir d'une part l'élasticité intrinsèque de la paroi vasculaire par un test de traction statique (détermination du module d'Young) et d'autre part la vasomotricité fonctionnelle déterminées sur anneaux artériels isolés de territoires vasculaires de différents calibres. Ces mesures ont été complétées par celles de la fréquence cardiaque et des pressions sanguines. Enfin, la quantification de l'élastine et du collagène de la paroi artérielle est réalisée en microscopie bi-photonique et par la génération de la seconde harmonique. Le protocole détaillé ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans **l'article 2**.

ARTICLE 2

Mechanical and Functional Vascular Impact of a non-hypocholesterolemic Atorvastatin Treatment in WHHL Rabbits.

TISSIER Florine⁽¹⁾, MALLEM Yassine⁽²⁾, GOANVEC Christelle⁽¹⁾, DIDIER Romain^(1,5), AUBRY Thierry⁽³⁾, BOURGEOIS Nathalie⁽²⁾, DESFONTIS Jean-Claude⁽²⁾, DUBREUIL Matthieu⁽⁴⁾, LE GRAND Yann⁽⁴⁾, MANSOURATI Jacques^(1,5), PICHAVANT-RAFANI Karine⁽¹⁾, PLEE-GAUTIER Emmanuelle⁽⁶⁾, ROQUEFORT Philippe⁽³⁾, THERON Michael⁽¹⁾, GILARD Martine^(1,5)

Affiliations :

⁽¹⁾ EA 4324 ORPHY, UBO, UFR Sciences et Techniques, 6 avenue Victor Le Gorgeu CS 93837, 29238 Brest Cedex 3, France.

⁽²⁾ Université LUNAM, Oniris, UPSP 5304 de Pathophysiologie animale et de Pharmacologie fonctionnelle, Nantes, France.

⁽³⁾ LIMATB, Equipe Rhéologie, EA4250 UFR Sciences et Techniques, 6 avenue Victor Le Gorgeu CS 93837, 29238 Brest Cedex 3, France.

⁽⁴⁾ EA 938 LSOL, UBO, UFR Sciences et Techniques, 6 avenue Victor Le Gorgeu CS 93837, 29238 Brest Cedex 3, France.

⁽⁵⁾ Département de Cardiologie, CHRU Brest, Brest, France

⁽⁶⁾ Département de Biochimie et Pharmacotoxicologie, Chru Brest, Brest, France

elastin in the aorta (with two-photon and second harmonic generation microscopy). An increase in PWV was observed throughout the experiment in the control group; atorvastatin prevented this increase. At 12 month, the PWV was higher in the control group compared to the atorvastatin group ($5,17 \pm 0,50$ vs $2,14 \pm 0,34$ m.s⁻¹ in control and treated groups respectively). Moreover, at 12 month, the percentage of elastin was lower in the control group compared to the treated group. It is possible to speculate that the observed change in PWV was due to the modification in structural component of the vessel. In conclusion, a chronic very low dose of atorvastatin appears to prevent the loss of elasticity in the aorta in the WHHL rabbits.

INTRODUCTION

The use of statins such as atorvastatin is recommended to prevent clinical complications of atherosclerosis like myocardial infarction, stroke or peripheral arterial diseases [Stone et al., 2014]. Indeed, these HMG Co A reductase inhibitors reduce the development of atherosclerosis [Makris et al., 2010] and the occurrence of cardiovascular events [Amarenco et al., 2004] through mechanisms dependent or independent of their lipid lowering effects [Blum, 2014; Satoh et al., 2015] like their antithrombotic effects [Owens and Mackman, 2014], the reduction of inflammation [Antonopoulos et al., 2012], or oxidative stress [Murrow et al., 2012]. If the use of statins in secondary prevention is well established, their

ABSTRACT

This work is based on the hypothesis that a non hypocholesterolemic atorvastatin treatment on WHHL rabbits could impact the mechanical and functional characteristics of its arteries. An atorvastatin treatment (2.5 mg/kg/day) was tested against controls on 34 male 3 to 12 month-old rabbits and this treatment had neither effect on triglycerides, HDL nor LDL. The Arterial stiffness was evaluated on vigil animals by pulse wave velocity (PWV) measurement. Then, in vitro measurements were made to evaluate (1) the endothelial function and vascular smooth muscle (on isolated vascular rings), (2) the elasticity of the arterial wall (with a static tensile test) and (3) the composition in collagen and

interest in primary prevention is still to be fully evaluated. Several studies have shown that lipid-lowering doses of statins in individuals with high circulating lipid level reduced the atherosclerotic cardiovascular risk (see review by Bruckert and Ferrières, 2014). Moreover, statins were shown to contribute to plaque stabilization [Libby and Aikawa, 2003] as well as to improve the endothelial function [De Jongh et al., 2002]. Thus, they could be relevant for primary prevention. However, these high-doses and long-term treatments can induce adverse effects. The most common adverse effect described is a myotoxicity [Pasternak et al., 2002] but others, less frequent, could appear such as hepatotoxicity [Russo et al., 2014] or an increased risk of intracerebral hemorrhage [Westover et al., 2011]. Thus, in order to limit these phenomena, low doses of statins could be used. To our knowledge, no study focusing on very low-dose (non-hypolipidemic effect) and long-term treatment in vivo was available. Hence, our work aims at analyzing the impact of low doses of statins on the vascular system in primary prevention of atherosclerosis. A study in Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits was performed to determine if atorvastatin (the most prescribed statin) could improve the functionality of the vascular system, at a non-hypocholesterolemic dose. The WHHL rabbit was chosen as a model of hypercholesterolemia and spontaneous development of atherosclerosis (similarly to that developed in humans) [Shiomi and Ito, 2009]. Arterial stiffness has been evaluated on vigil animals by pulse wave velocity measurement; blood pressure and heart rate were also recorded. In vitro measurements were made to test (1) the endothelial function and vascular smooth muscle (on isolated vascular rings), (2) the elasticity of the arterial wall (with static tensile test) and (3) the composition in collagen and elastin in the

aorta (with two-photon and second harmonic generation microscopy).

MATERIAL AND METHODS

1. Animals

This study was performed in accordance with the European Council revised guidelines on animal care for experimental and other scientific purposes. Experiments were approved by the local ethic committee for animal experimentation (Authorization number: CEEA.2012.189). Experimental project was conducted in compliance with “The guide for the care and use of laboratory animals” published by the National Institute of Health (NIH publication, Eight edition, 2010). This study was performed on male homozygous WHHL rabbits (3165±489g) produced by CPA Jeanrot (FRANCE, 45160 Olivet).

During the experiment, animals were kept at the veterinary school of Nantes (Oniris, France) in an animal house under a 12-hours light-dark-cycle at 21°C. Food (Lapin Clapier PDC; Le Pré du Clocher; 44155 Ancenis). Water and food were given ad libitum.

2. Experimental design

Our study was performed on thirty four 3 month-old WHHL rabbits from the age of 3 to 12 months. They were randomized in two groups: control (C) and treated (T).

Treated group received 2.5mg/Kg body weight (bw)/day of atorvastatin (atorvastatin calcium PF-00079943-07 Pfizer) diluted in drinking water. Water with treatment was given in the first bottle of the day. When all this water was drunk, fresh water was given ad libitum. The control group had fresh water ad libitum. Animals were weighted every week to adjust the treatment. Every month, pulse wave velocity and blood sampling were performed on each animal. Every 3 months, control rabbits (at the age of 3,

6, 9 and 12 month) and treated animals (at the age of 6, 9 and 12 months) were anaesthetized and euthanized for other analyses.

3. Measured parameters

3.1 Blood sampling and analysis

Blood sampling was performed on vigil animals at 10, 11 and 12 months from the median artery of the ear with a catheter (Vasofix certo 24G Braun réf 4269071) in a dry tube with gel (Vacuette 456071). It was made under local anaesthesia with lidocaine (Lidocaïne Prilocaine Biogaran 5% ointment). Serum was removed after spontaneous coagulation and frozen in liquid nitrogen until analysis. After serum unfreezing at room temperature, triglycerides and HDL were measured on a Siemens dosage chain (CA12340063) with ADVIA reactivities. LDL was measured with a specific kit (LDL quantitation kit MAK045; Sigma-Aldrich).

3.2 Pulse wave velocity (PWV)

Every month, PWV measurements were made on vigil animals as previously described. Briefly, a piezo electric sensor (AD instruments) was placed on the auricular artery and another on the caudal one. The distance (d) between the two sensors was measured. Recordings of pulses were made during 10 minutes with the software LabChart 7 (AD instruments). 30 measurements of the time interval (Δt) between the wave front of the auricular waveform and that of the caudal waveform were taken. The PWV was calculated using the formula $PWV (m.s^{-1}) = d/\Delta t$.

3.3 Arterial blood pressure and heart rate measurements

Arterial blood pressure and heart rate were measured on 12 month-old rabbits from control and treated groups after anaesthesia with intramuscular injection of ketamine (100mg/kg bw) and xylazine (10mg/kg bw). The arterial

blood pressure was measured with a catheter inserted in the carotid (connected to a pressure sensor and a MP35, Biopac Systems, Inc.). The analysis of the recording was made on the BSL Pro 3.7 software and allowed to measure, systolic, diastolic, differential and mean blood pressures. Heart rate was also calculated.

3.4 Aorta dimensions

Aorta dimensions were measured every 3 months using optical coherence tomography (OCT). A 0,014 mm BMW (ABOTT®) conventional angioplasty guidewire was inserted, under radioscopy control, into the carotid until iliac bifurcation allowing the placement of the OCT image catheter. Previously anaesthetized rabbits were heparinized (0.5ml at 5000 U/ml) and then, euthanized with an intra-arterial injection of ketamine (100mg/kg bw) and xylazine (10mg/kg bw). 15 ml of contrast media meglumine and sodium ioxaglate 320 mg iodine/ml (Hexabrix 320 Guerbet) was flushed manually through the guiding catheter at a rate of 1.5 ml/s. When a blood-free image was observed, the OCT imaging core (Terumo FastView op-16p2613) was withdrawn at a rate of 10 mm/s by using stand-alone electronic control of the pull-back motor. Images were performed from the iliac bifurcation to the aorta arch for each rabbit. Images acquired with OCT Lunawave (Terumo) were stored digitally for subsequent analysis.

3.5 In vitro measurements on vessel samples

Vessels were sampled every three months on euthanized rabbits from each group to determine the mechanical properties of the aorta, the vasoreactivity and the elastin/collagen ratio.

3.5.1 Mechanical properties of the aorta

They were assessed using a static uniaxial tensile test. The first 2cm segment after the aortic arch was removed as quickly as possible after

euthanasia. Vessels were placed into a saline solution (in mM: NaCl 137 ; KCl 5.4 ; CaCl₂ 2.5; Na₂HPO₄ 1.2; MgCl₂ 1.2; Hepes 20; D Glucose 15, pH 7.4) at 4°C before analysis 12 hours later. Aorta was opened to form a planar surface and two rectangular pieces were cut (6 mm in the longitudinal direction of the aorta, 4 mm in the transversal one). Tensile tests were performed in the longitudinal direction of the aorta. Sample ends covered with a small piece of blotting paper soaked with saline solution were fixed between the grips; the same saline solution was also used to maintain the samples wet during the whole test. A static uniaxial tensile test was carried out with a dynamic mechanical thermal analyser (DMTA) VA4000 testing device (01db-Metravib) at ambient temperature. All samples were tested at a constant rate of 50 µm/s, and the nominal stress, that is the force at time t divided by the initial sample section, was measured as a function of the Cauchy strain, that is the sample length between the lower and upper grips at time t, divided by its initial value. All samples were extended up to a Cauchy strain of 2.5. The mechanical property of aortas discussed in the paper is the linear elastic modulus in the aorta longitudinal direction, characterized by the Young's modulus determined from the linear part of the stress/strain curves, at low strains.

3.5.2 Vasoreactivity

Vessels were sampled from three different territories (aorta, carotid, mesenteric) and washed in the previously described saline solution.

Vessels, placed in iced saline solution previously gassed with 95%O₂-5%CO₂, were carefully dissected under microscope to remove surrounding connective tissues and cut into rings of 2 mm. Two rings from each vessel were mounted between two 0.025 stainless-steel wires in a 5 ml organ bath containing 5ml of saline solution maintained at 37°C. Rings were

progressively stretched to a resting tension of 6g for aorta and 2g for carotid and mesenteric arteries. Isometric tension was recorded using a force displacement transducer (MP150, Biopac systems Inc., EMKA Technologies), and displayed on a computer with LabChart 7 software (ADInstruments). Rings were allowed to equilibrate for a 45 min period and washed with saline solution every 15 min. Thereafter, rings were contracted with 2.5.10⁻⁴ M phenylephrine (PE). Response to acetylcholine cumulative doses (Ach, 10⁻⁹ to 3.10⁻⁴M) was made. Between trials, the rings were allowed to recover for 45 min with washes every 5-10min. After another pre-contraction with PE 2.5.10⁻⁴ M, cumulative doses of sodium nitroprusside (SNP 10⁻⁹ to 3.10⁻⁴ M to aorta and carotids, SNP 10⁻¹⁰ to 3.10⁻⁵ M to mesenteric) were tested.

The dilating responses were expressed as percentages of the PE-induced precontractile force. The logarithm of the concentration of Ach (respectively SNP) that elicited 50% of the maximal response (E_{max}) was designated as the EC₅₀. These values were ascertained for each animal by logistic curve fitting of the semilogarithmic dose-response relationship with TableCurve software 2D (5.01.01 version).

3.5.3 Elastin and collagen quantification

Aorta samples were fixed in Bouin's solution (Bouin Gurr® 7000.1000, VWR) for 48h and then, included in paraffin (Paraplast®PLUS). Section of 5µm from 12 months rabbits was deparaffined and mounted with Neo-Mount® (Merck Millipore 109016).

Two-photon and second harmonic generation microscopy was performed in parallel using a modified confocal microscope (FV300/BX51WI, Olympus) and a femtosecond Ti:Sapphire laser (Verdi-V5/Mira, Coherent) tuned at λ=830nm as the light source. In order to avoid photobleaching, the laser power was limited to about 100mW at the objective of the microscope

(20X, 0.75NA, UPlanSApo, Olympus). Endogenous two-photon excitation fluorescence (TPEF) from elastin was epi-collected and descanned, then filtered by the dichroic mirror (DCRXU675, 675nm cut-off wavelength, Chroma) of the scanning unit before to be detected by the internal photomultiplier tube (PMT) of the microscope (R928, Hamamatsu). The voltage of the internal PMT was set to 640V for all experiments. Second harmonic generation (SHG) from collagen was collected in transmission by the condenser of the microscope, then passed through a 10nm-FWHM band-pass filter centered on the second harmonic of the laser at 415nm (NT65-680, Edmund Optics) in order to reject the TPEF light. The SHG signal was then detected by an external PMT module (H5783, Hamamatsu) connected to a transimpedance amplifier (C7319, Hamamatsu, 10^6 V/A gain). The voltage of the external PMT was set to 810V for all experiments. IR blocking filters (Schott BG39 model, Edmund Optics) were inserted on both TPEF and SHG detection pathways to remove the light from the laser. The lateral and axial resolutions of the microscope were estimated to be respectively about $0.5\mu\text{m}$ and $3\mu\text{m}$ for the 0.75NA objective lens used (Zipfel et al., 2003). It is worthwhile to notice that the axial resolution was closed to the thickness of the samples ($5\mu\text{m}$), which means that the TPEF and SHG signals result from almost the whole thickness of the samples. 12 bit intensity resolution and 2048×2048 definition TPEF and SHG images were acquired in parallel at the slower scanning speed of the microscope, corresponding to a pixel dwell-time of about $10\mu\text{s}$. Images were exported in .tif format to be analyzed with ImageJ software.

4. Statistical analysis

Statistical tests were performed using SIGMA STATS 10 (StatSoft). Time effect and differences between groups were tested with an

all-pairwise multiple comparison procedures (Student-Newman-Keuls or Kruskal Wallis method) including matched samples when possible. All results were presented as Medians \pm IQR. Differences were considered as significant when $p < 0.05$.

RESULTS

1. Blood parameters

The plasmatic concentrations measured at the end of the experimentation for the control and treated groups were respectively $5,33 \pm 1,56$ mM ($n=15$) and $3,95 \pm 1,83$ mM ($n=15$) for triglycerides, $0,57 \pm 0,25$ mM ($n=15$) and $0,55 \pm 0,19$ mM ($n=16$) for HDL, $14,48 \pm 2,68$ mM ($n=15$) and $14,93 \pm 6,68$ mM ($n=14$) for LDL. No significant effect of the treatment was observed for any of these parameters.

2. Pulse wave velocity

PWV measurements are presented in Figure 1 for the two experimental groups. Aging led to a significant increase of PWV in control group (from 2m.s^{-1} at 3 months to 5m.s^{-1} at 12 months). No change was observed in the treated group throughout the experiment: PWV was maintained close to 3m.s^{-1} and was significantly lower when compared to the control group at 12 months.

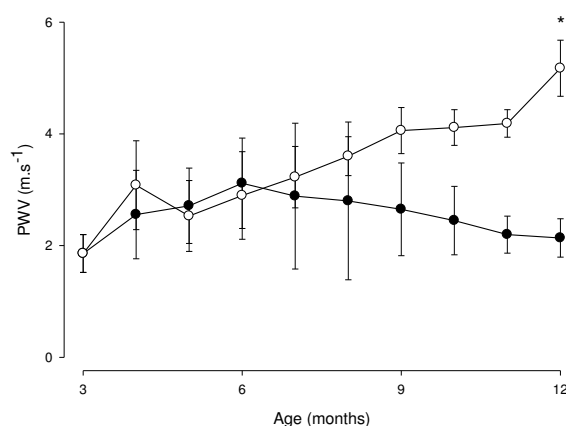


Figure 1. Evolution of pulse wave velocity (PWV) during time in the control (\circ) and the treated groups (\bullet). Data are expressed as Medians \pm IQR. * indicate significant difference at 12 months ($p < 0.05$).

3. Blood pressure and cardiac frequency

At 12 months, no difference was observed between control and treated group on mean arterial pressure (114 ± 22 mmHg), systolic pressure (143 ± 17 mmHg), diastolic pressure (92 ± 18 mmHg), differential blood pressure (42 ± 3 mmHg) and heart rate (163 ± 36 beat per min).

4. Aorta dimensions

Artery wall thickness was significantly thinning from the aortic arch to iliac bifurcation. No statistical difference was observed between linear regression curve of control and treated groups at 12 months (Figure 2). Moreover, no difference in total aorta length ($p > 0.01$) was observed over time. Thus 3, 6, 9 and 12 month-old rabbits had the same aorta length.

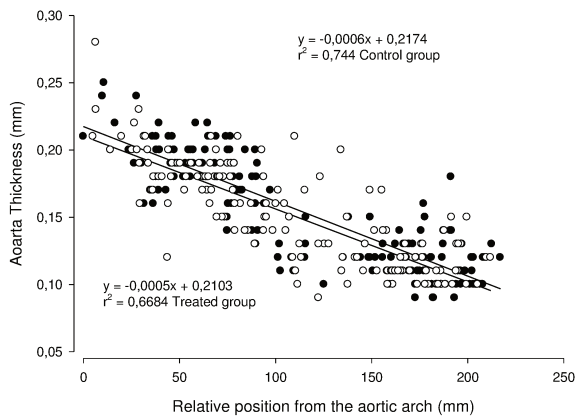


Figure 2. Artery wall thickness as a function of the position along the aorta and linear regression curve in control (○) and treatment (●) groups at 12 months (0 is the position of the aortic arch).

5. Static tensile test

For each rabbit, a stress/strain curve of the aorta was plotted, as depicted in figure 3. All stress/strain curves are non-linear over the whole investigated elongational strain range, but exhibit a linear portion at low strains, as highlighted in

the inset of figure 3. A linear fit of the low strain part of the stress/strain curve allowed us to determine the Young's modulus E , as shown in the inset.

The evolution of Young's modulus (E) with age was presented in figure 4. In control group, E increased significantly with time, from 50 kPa at 3 months to 110 kPa at 12 months. In the treated group E ranged between 50 and 65 kPa, and was significantly different from the control at 12 months.

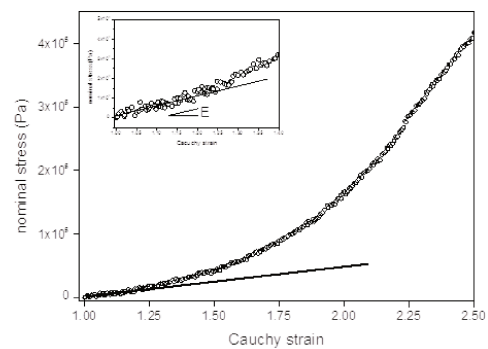


Figure 3: Example of a stress/strain curve: nominal stress as a function of Cauchy strain of the thoracic aorta of a Watanabe rabbit in longitudinal tensile test.

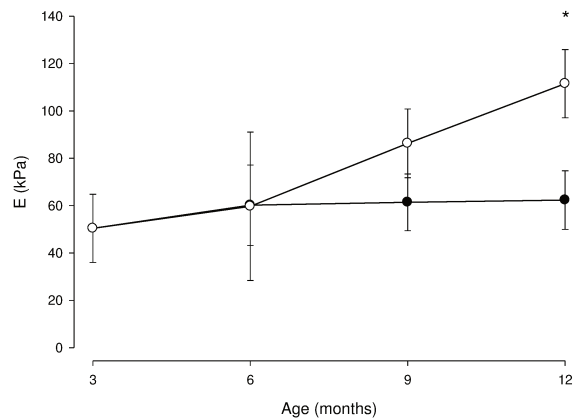


Figure 4. Young's modulus (E) as a function of age in the control (○) and the treatment groups (●). Data are expressed as Medians \pm IQR. * indicates a significant difference between control and treated groups at 12 months ($p < 0.05$).

6. Vasoreactivity

E_{max}, and EC₅₀ in response to PE, Ach and SNP in the three different arterial territories (aorta, carotid and mesenteric) are presented in Table 1.

6.3 Endothelium-independent relaxation

to SNP
Whatever the vessel, no change in E_{max} and EC₅₀ values was observed.

		Aorta			Carotid			Mesenteric		
Age (months)		6	9	12	6	9	12	6	9	12
ACh	E_{Max}(%)	68.01±0.0	51.86±13.	54.94±8.5	75.97±0.0	88.64±3.1	70.48±14.	94.04±2.6	65.81±46.	ND
	Control	70.55±12.	51.61±6.3	41.26±5.7	79.07±7.1	72.58±0.8	80.90±15.	84.12±6.8	98.12±35.	83.79±7.7
	Treated	55	5	6	1	4	07	7	92	8
	EC₅₀(M)									ND
Control	2.54.10 ⁻⁷ ±0.00	1.57.10 ⁻⁷ ±3.60.10 ⁻⁸	1.61.10 ⁻⁷ ±2.33.10 ⁻⁷	8.04.10 ⁻⁸ ±0.00	4.77.10 ⁻⁸ ±2.84.10 ⁻⁷	5.56.10 ⁻⁸ ±3.70.10 ⁻⁹	4.54.10 ⁻⁸ ±2.22.10 ⁻⁸	2.96.10 ⁻⁸ ±7.38.10 ⁻⁸		
Treated	2.09.10 ⁻⁷ ±2.25.10 ⁻⁸	1.13.10 ⁻⁷ ±4.46.10 ⁻⁸	1.75.10 ⁻⁷ ±5.1.10 ⁻⁸	3.84.10 ⁻⁸ ±1.35.10 ⁻⁷	3.99.10 ⁻⁸ ±1.03.10 ⁻⁸	4.12.10 ⁻⁷ ±9.62.10 ⁻⁸	7.52.10 ⁻⁸ ±7.10.10 ⁻⁹	4.23.10 ⁻⁸ ±6.61.10 ⁻⁸	4.95.10 ⁻⁷ ±5.16.10 ⁻⁷	
SNP	E_{Max}(%)	115.17±1	136.65±3	79.45±29.	77.72±8.2	93.98±3.4	98.86±20.	100.96±2.	98.78±96.	90.81±9.5
	Control	8.0	7.2	9	1	8	41	51	45	7
	Treated	109.25±6	87.11±9.7	86.12±3.0	83.08±11.	91.51±1.7	82.69±5.7	95.73±0.6	102.99±2.	98.12±14.
	EC₅₀(M)									
Control	5.72.10 ⁻⁵ ±5.67.10 ⁻⁵	2.75.10 ⁻⁴ ±2.74.10 ⁻⁴	1.48.10 ⁻⁶ ±1.78.10 ⁻⁶	2.96.10 ⁻⁷ ±2.8.10 ⁻⁸	2.15.10 ⁻⁷ ±1.35.10 ⁻⁷	3.61.10 ⁻⁷ ±6.06.10 ⁻⁷	1.03.10 ⁻⁷ ±8.77.10 ⁻⁸	8.80.10 ⁻⁷ ±8.08.10 ⁻⁶	5.46.10 ⁻⁷ ±7.15.10 ⁻⁷	
Treated	1.48.10 ⁻⁵ ±8.53.10 ⁻⁵	1.21.10 ⁻⁶ ±8.43.10 ⁻⁷	1.51.10 ⁻⁶ ±2.52.10 ⁻⁶	6.28.10 ⁻⁷ ±8.82.10 ⁻⁷	1.7.10 ⁻⁷ ±3.73.10 ⁻⁷	3.26.10 ⁻⁷ ±3.5.10 ⁻⁷	3.29.10 ⁻⁷ ±1.28.10 ⁻⁶	5.88.10 ⁻⁹ ±1.59.10 ⁻⁸	3.89.10 ⁻⁸ ±5.03.10 ⁻⁷	
PE	E_{Max}(g)	6.48±0.63	4.52±2.20							
	Control	5	5	6.34±0.32	8.33±1.49	6.11±2.61	7.18±4.18	1.35±0.50	0.79±0.21	0.82±0.07
	Treated	7.55±2.38	7.61±1.31	5.68±2.35	5.81±1.09	6.54±1.78	4.62±0.69	0.97±0.08	1.39±0.12	1.04±0.35

Table 1. Response to acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (SNP) and phenylephrine (PE) exposition of aorta, carotid and mesenteric rings. Data are expressed as Medians±IQR.

6.1 PE-induced vasoconstriction

A single dose of PE (10⁻⁴M) allowed to obtain a maximal ring contraction (E_{max}). No statistical difference in E_{max} was observed with time or treatment.

6.2 Endothelial-dependent relaxation induced by ACh

ACh relaxation of aorta and carotid rings from the treated group were not different from the control group and no time effect was observed. At 12 months, for mesenteric in the control group, EC₅₀ and E_{max} could not be measured due to a complete absence of response of this artery to Ach. On the contrary, the treated group exhibited at 12 months a response similar to those previously observed (Figure 5).

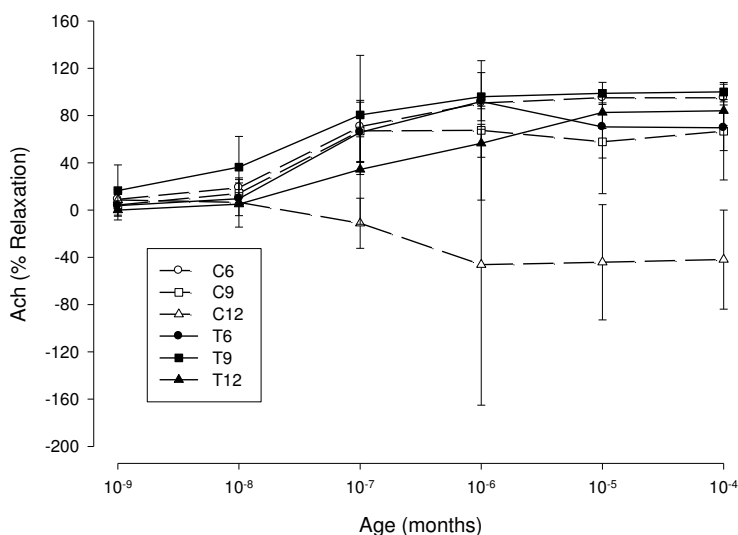


Figure 5. Dose-response curves of mesenteric rings to acetylcholine (ACh). Data are expressed Medians±IQR.

7. Elastin and Collagen quantification

Figure 6a displays a combined TPEF/SHG image of a section of 12 month rabbit vessel. Elastin, which is the main source of endogeneous TPEF

signal in vessel walls, is represented in yellow. Collagen, which is the exclusive source of SHG signal owing to its non-centrosymmetric organization, is represented in blue. TPEF image (figure 6b) reveals the typical lamellar structure of elastin fibers. However, a non-negligible background remains and could be attributed to the residual emission of cellular NAD(P)H and fibroblasts at this excitation wavelength (Boulesteix et al., 2006). In order to isolate the elastin fibers as much as possible, an intensity threshold was applied to the TPEF image, taking advantage that TPEF signal from elastin is generally stronger than the remaining fluorescence background from the non-fibrous component of the vessel. The threshold image was then binarized (see inset of figure 6b) to quantify elastin by counting the number of pixels over the preset threshold (pixels “ON”) within selected ROIs. The result, which is given in % of the total area of the ROIs, represents elastin fibers density within the vessel. The SHG image of figure 6c shows that collagen is located at the external part of the vessel. The contrast of the collagen fiber in the SHG image is very high since type I fibrillar collagen exhibits a strong SHG response (Williams et al., 2005) and is particularly abundant in vessel walls.

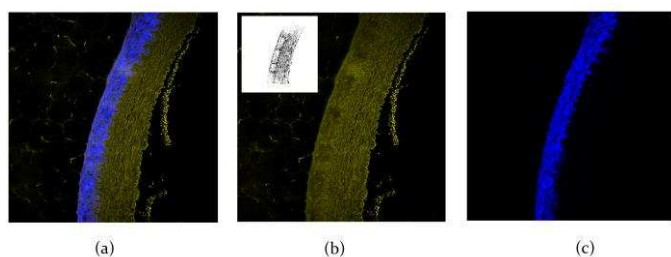


Figure 6. (a) Combined TPEF/SHG image. (b) TPEF image: the signal mainly arises from elastin fibers. The inset displays the resulted threshold and binarized image used for quantification of elastin only. (c) SHG image: the signal exclusively arises from collagen fibers.

Furthermore a recent analysis of SHG images of type I collagen showed that the relative number of pixels “ON” is a good indicator of the collagen amount in the tissue, although SHG images are often partly saturated due to the huge dynamic of the SHG response of fibrillar collagen (Sevrain et al., 2015). Collagen in our SHG images of vessels was then quantified by counting the relative number of pixels over a preset threshold, whose value was chosen to remove the background noise of the images. The result is expressed in % of the total area of selected ROIs.

Results are summarized on figure 7. At 12 months, no significant difference was observed for collagen between control and treated groups. However, a significant difference can be observed for elastin between control and treated groups at 12 months.

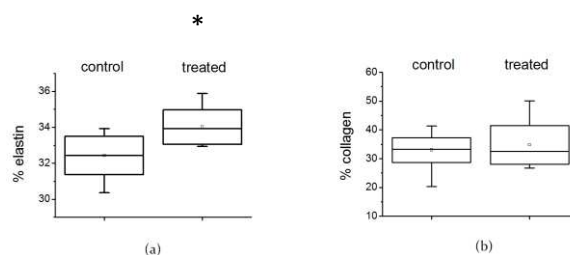


Figure 7. Quantification of elastin (a) and collagen (b) in control (14 samples) and treated (10 samples) groups of 12 month-old WHHL rabbits. Data are presented as Medians, IQR and ranges. *P value<0.05.

DISCUSSION

The aim of this study was to examine the potential effects of a low dose atorvastatin treatment on the vascular function in a high cardiovascular risk population. For this, 34 WHHL rabbits were submitted or not to an atorvastatin treatment since the age of three months until the age of twelve months.

The two preliminary steps were: (1) the analysis of the lipid lowering effect of the atorvastatin treatment and (2) the aorta morphological study in optic coherence tomography. When

considering the hypolipidemic effect of the treatment, the dose used in this study may be considered as a low dose since no change in circulating levels of HDL, LDL and triglycerides could be observed. In fact, in human studies statin treatments are considered as “low-dose statin therapy” when doses are below those currently prescribed but still with a lipid lowering effect [Dirisamer et al., 2003; Tawakol et al., 2011; Kunt et al., 2015]. Looking at the OCT study, we have shown that, despite an age difference, there is no aortic length difference and there is no thickness modification during the treatment. This makes it possible to directly compare the two groups of animals through the complete duration of the experiment.

The overall effect of the treatment on vigil animals was evaluated by measuring the pulse wave velocity [Lawrence et al., 2006]. This measure evidence progressive stiffening in non-treated WHHL conductance arteries. This arterial pathological aging is completely prevented in the presence of atorvastatin, at least until the end of the study on 12 months old animals. It is important to remind that the pulse wave velocity is a cardiovascular risk indicator whose predictive value has been largely demonstrated [Vlachopoulos et al., 2010]. Consequently, this result shows that the statin treatment may have a vascular effect independently of any major action on the levels of circulating lipids. PWV is due essentially to the deformability of the large arteries. In humans, a low lipid-lowering dose of atorvastatin (10 mg/day) can reduce PWV in hypertensive and hypercholesterolemic subjects [Kanaki et al., 2013]. In our study, heart rate and blood pressure are however not impacted at 12 months; the reported difference of elasticity in the arterial wall is not sufficient to modify these basic parameters. The difference in PWV observed between treated and control animals could result from either a functional or a structural alteration of the conductance arteries.

Functional aspects were evaluated on vascular isolated rings of aorta, carotid and mesenteric arteries. Actually, statins, used at lowering-cholesterol dose, were shown to have an impact on endothelial function via the upregulation of endothelium nitric oxide synthase (eNOS), resulting in an increase of NO bioavailability [Cheng et al., 2013; Zemankova et al., 2015]. This effect could be observed in different territories such as aorta [Gong et al., 2014], cerebral arteries [Sander et al., 2005; Gianopoulos et al., 2012] or cutaneous micro vessels [Holowatz et al., 2011]. In this study, after a PHE contraction of the vessel, the endothelial-dependent relaxation was tested by cumulative concentration of Ach and the endothelial-independent relaxation by SNP. On aorta and carotid, isolated rings show no change in endothelial function and vascular smooth muscle activity with time or treatment. From these results it is possible to conclude that the difference observed in PWV is not the consequence of a modification of functionality of these large caliber vessels. On the mesenteric artery, the treatment prevents the occurrence of endothelial dysfunction at 12 months, demonstrating a protective effect of statin on the endothelial function in this experiment but this result does not explain by itself the change of PWV.

Arterial stiffening, particularly in the context of atherosclerosis, is often attributed to an increase in intima-media thickness [Popele Van et al., 2001]. This hypothesis is not supported by the measurements of the arterial wall: no thickness modification was observed when comparing control and treated groups. However, a structural modification of the arteries has been suggested by the static tensile tests. The arteries were shown to exhibit a non-linear elastic behavior, which is observed in many biological network forming systems [Dobrynin and Carillo; 2011]. In this study, we focused on the linear elastic

properties which were characterized by the Young's modulus at low strains. The increase of the Young's modulus with time in the control group reflects an increase of rigidity (or equivalently a loss of elasticity) of the arterial vascular tissue. This result differs from the Young's modulus value of the treated group that seems to be maintained over time. Such a statin effect has previously been described in the literature, and has been shown to be dose-dependent. In healthy subjects, a non-cholesterol-lowering dose might improve the vascular elasticity [Lunder et al., 2011], whereas high doses would have no effect on elasticity [Ballard et al., 2014]. This difference of elasticity evolution with time between treated and non-treated groups could result from differences in the composition or in the topology of the extracellular matrix networks responsible for the elasticity of the tissues. It can also be attributed to the presence or the calcification of atherosclerotic plaques [Puri et al., 2015].

In the case of the aorta, the mechanical behavior is classically due to the mechanical response of the different components of the network forming the artery wall: collagen and elastin [Assoul et al., 2008]. In this study, the percentage of collagen was not modified by the treatment. Thus, this component seems not to be involved in the improvement of elasticity previously observed. However, changes in collagen types or orientation of its fibers can't be excluded [Karimi et al., 2015]. In contrast, the percentage of the second component, elastin, was significantly higher at 12 months in treated group when compared to the control group. In WWHL rabbit, a decrease of the amount of elastin in time (from 100mg/g of insoluble elastine at 6months to 60 mg/g at 2.5 years) has been previously shown [Dalessandri et al., 1994]. Thus, the atorvastatin used in this study could have prevented this elastin reduction via a lower degradation by proteases or as a consequence of its action on

inflammatory processes [Abisi et al., 2008; Briones et al., 2009; Blankier et al., 2011]. It is nevertheless important to point out that atherosclerosis can induce an increase of the number of smooth muscle cells and their migration (Ip et al. 1990) and that statins have been shown to decrease the number of these cells [Fukumoto et al., 2001]. Thus, in our model which spontaneously develops atherosclerosis, the reduced percentage of elastin observed in the control group could be due to a relative increase in smooth muscle cell number. Further investigations are necessary to test this hypothesis. It could also be interesting to assess vascular oxidative stress since ROS have been shown to be linked with aortic elasticity preservation by atorvastatin in diabetic rats [Wang et al., 2014].

This study is a new contribution to the analysis of the effects of a low dose of statin used at concentrations below its lipid-lowering effect. It clearly shows a beneficial effect of such a treatment on the vascular system of the atherosclerotic WHHL rabbit. The improvement observed in vivo appears to be due to compositional changes of the arterial wall consecutive to this long term treatment and independent to functional vascular effects.

REFERENCES

- Abisi S, Burnand KG, Humphries J, Waltham M, Taylor P, Smith A. Effect of statins on proteolytic activity in the wall of the abdominal aortic aneurysms. *British journal of surgery*. 2008;95(3):333-337
- Afilalo J, Duque G, Steele R, Jukema JW, de Craen A, Eisenberg MJ. Statins for secondary prevention in elderly patients a hierarchical Bayesian meta-analysis. *JACC*. 2008;51:37-45.
- Amarenco P, Labreuche J, Lavalley P, Touboul PJ. Statins in stroke prevention and carotid

- atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. *Stroke*.2004;35:2902-2909.
- Antonopoulos AS, Margaritis M, Lee R, Channon K and Antoniades C. Statins as anti-inflammatory agents in atherogenesis: molecular mechanisms and lessons from the recent clinical trials. *Current Pharmaceutical design*. 2012; 18:1519-1530.
- Assoul N, Flaud P, Chaouat M, Detourneur D, and Bataille I. Mechanical properties of rat thoracic and abdominal aortas. *Journal of Biomechanics*. 2008;41:2227-2236.
- Ballard KD, Taylor BA, Capizzi JA, Grimaldi AS, White CM and Thompson PD. Atorvastatin treatment does not alter pulse wave velocity in healthy adults. *International Scholarly Research Notices* 2014; 5p.
- Blankier S, McCrindle BW, Ito S, Yeung RSM. The role of atorvastatin in regulating the immune response leading to vascular damage in a model of Kawasaki disease. *Clinical and experimental immunology*. 2011;164(2):193-201
- Blum A. HMG-CoA reductase inhibitors (statins), inflammation, and endothelial progenitor cells_ New mechanistic insights of atherosclerosis. *BioFactors* 2014 40(3):295-302.
- Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering –are they clinically relevant? *Eur Heart J*. 2003;24:225-248.
- Bonnet. Statin and atherosclerotic plaque. *Archives of cardiovascular diseases supplements*. 2012; 4:284-290.
- Boulesteix T, Pena AM, Pagès N, Godeau G, Sauviat MP, Beaurepaire E, Schanne-Klein MC. Micrometer scale ex vivo multiphoton imaging of unstained arterial wall structure, *Cytometry A*. 2006: 69(1):20-6.
- Briones AM, Rodriguez-Criado N, Hernanz R, Garcia-Redondo AB, Rodrigues-Diez RR, Alonso MJ, Egido J, Ruiz-Ortega M, Salices M. Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. *Hypertension*. 2009;54:142-149
- Chaipichit N, Krska J, Pratipanawatr T and Jaremsiripornkul N. Statin adverse effects: patients' experiences and laboratory monitoring of muscle and liver injuries. *Int J Clin Pharm*. 2015;37:355-364.
- Cheng WH, Ho WY, Chang CF, Lu PJ, Cheng PW, Yeh TC, Hong LZ, Sun GC, Hsiao M and Tseng CJ. Simvastatin induces a central hypotensive effect via Ras-mediated signaling to cause eNOS up-regulation. *Br J Pharmacol*. 2013;170(4):847-858.
- Dalessandri KM, Eisele P, Wong TS, Parker J and Rucker RB (1994). Elastin degradation in the aorta of Watanabe hereditary hyperlipidemic rabbits. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1994;74:117-120.
- Davignon. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation*. 2004;109suppl3:39-43.
- De Jongh S, Lilien MR, Roodt J, Stroes ESG, Bakker HD and Kastelein JJP. Early statin therapy restore endothelial function in children with familial hypercholesterolemia. *JACC*. 2002; 40(12):2117-2121.
- Dirisamer A, Hachemian N, Bucek RA, Wolf F, Reiter M and Widhalm K. The effect of low-dosesimvastatin in children with familial hypercholesterolemia: a 1-year observation. *European Journal of Pediatrics*. 2003; 162(6):421-425.
- Dobrynin AV and Carillo JMY. Universality in nonlinear elasticity of biological and polymeric networks and gels. *Macromolecules*. 2011;44:140-146.

- Douglas G and Channon KM. The pathogenesis of atherosclerosis. *Medicine*. 2014;42:480-484.
- Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, Hill CC, Enomoto M, Hirouchi Y, Shiomi M and Aikawa M. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation*. 2001;103:993-999.
- Giannopoulos S, Katsanos AH, Tsvigoulis G and Marshall RS. Statins and cerebral hemodynamics. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2012; 32:1973-1976.
- Gong X, Ma Y, Ruan Y, Fu G, Wu S. Long-term atorvastatin improves age-related endothelial dysfunction by ameliorating oxidative stress and normalizing eNOS/iNOS imbalance in rat aorta. *Exp Gerontol*. 2014;52:9-17.
- Holowatz LA, Santhanam L, Webb A, Berkowitz DE and Kenney WL. Oral atorvastatin therapy restores cutaneous microvascular function by decreasing arginate activity in hypercholesterolaemic humans. *J Physiol*. 2011;589(8):2093-2103.
- Ip J, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: Role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *JACC*. 1990;15(7):1667-1687
- Kanaki AI, Sarafidis PA, Georgianos PI, Kanavos K, Tziolas IM, Zebekakis PE and Lasaridis AN. Effects of low-dose atorvastatin on arterial stiffness and central aortic pressure augmentation in patients with hypertension and hypercholesterolemia. *American Journal of Hypertension*. 2013;26(5): 608-616.
- Karimi A, Navidbakhsh M, Shojaei A. A combination of histological analyses and uniaxial tensile tests to determine the material coefficients of the healthy and atherosclerotic human coronary arteries. *Tissue and Cell*. 2015;47:152-158
- Kunt A, Ozcan S, Kucuker A, Odabasi D, Sami Kunt A. Efficacy of chronic statin therapy on major cardiac events after coronary artery bypass grafting: low-dose versus high-dose. *Med Glas (Zenica)*. 2015; 12(2):196-201.
- Laurent S, Cockcroft J, Bortel LV, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I and Struijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *European Heart Journal*. 2006; 27:2588-2605.
- Libby P and Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins. *The American journal of cardiology*. 2003; 91(4):4-8
- Lunder M, Janic M, Habjan S and Sabovic M. Subtherapeutic, low-dose fluvastatin improves functional and morphological arterial wall properties in apparently healthy, middle-age males – a pilot study. *Atherosclerosis*. 2011;215: 446-451.
- Makris GC, Lavidia A, Nicolaides AN, Geroulakos G. The effect of statins on carotid plaque morphology: a LDL-associated action or one more pleiotropic effect of statins? *Atherosclerosis*. 2010;213:8-20.
- Mills EJ, Rachlis B, Wu P, Devereaux PJ, Arora P, Perri D. Primary prevention of cardiovascular mortality and events with statin treatments. *JACC*. 2008;52:1769-1781.
- Owens AP and Mackman N. The Antithrombotic Effects of Statins. *Annual Review of Medicine*. 2014; 65:433-445
- Puri R, Nocholls SJ, Shao M, Kataoka Y, Uno K, Kapadia SR, Tuzcu EM and Nissen SE. Impact of Statins on Serial Coronary Calcification During Atheroma Progression and Regression. *JACC*. 2015; 65(13):1273-1282.

- Russo MW, Hoofnagle JH, Gu J, Fontana RJ, Barnhart H, Kleiner DE, Chalasani N and Bonkovsky HL. Spectrum of statin hepatotoxicity: experience of the drug-induced liver injury network. *Hepatology*. 2004; 60(2): 679-686.
- Sander K, Hof U, Poppert H, Conrad B and Sander D. Improved cerebral vasoreactivity after statin administration in healthy adults. *J Neuroimaging*. 2005;15(3):266-270.
- Satoh M, Takahashi Y, Tabuchi T, Minami Y, Tamada M, Takahashi K, Itoh T, Morino Y, Nakamura M. Cellular and molecular mechanisms of statins: an update on pleiotropic effects. *Clinical Science*. 2015; 129(2) :93-105.
- Sevrain D, Dubreuil M, Dolman G, Zaitoun A, Irving W, Guha N, Odin C, Le Grand Y. Evaluation of area-based collagen scoring by nonlinear microscopy in chronic hepatitis C-induced liver fibrosis. *Biomed. Opt. Express*. 2015; 6(4):1209-1218.
- Shiomi M and Ito T. The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: A tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis*. 2009; 207:1-7.
- Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Merz NB, Blum CB, Eckel RH, Goldberg AC, Gordon D, Levy D, Lloyd-Jones DM, McBride P, Schwartz JS, Shero ST, Smith SC, Watson K, Wilson PWF. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults. *Circulation*. 2014; 129 [suppl 2]: S1-S45.
- Tawakol A, Fayad ZA, Mogg R, Alon A, Subramanian S, Abdelbaky A, Nunes I, Herman G, Beals C, Shankar SS. High Dose Statin Results in a Further Reduction in Atherosclerotic Inflammation Compared with Low Dose Statin: Results of a Multi-Center PET-CT Study. *Circulation*. 2011; 124(supp21):A18242.
- Van Popele NM, Grobbee DE, Bots ML, Asmar R, Topouchian J, Reneman RS, Hoeks APG, Van der Kuip DAM, Hofman A and Witteman JCM. Association between arterial stiffness and atherosclerosis the Rotterdam study. *Stroke*. 2001;32:454-460.
- Vlachopoulos C, Aznaouridis K and Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(13):1318-1327.
- Wang CH, Chang RW, Ko YH, Tsai PR, Wang SS, Chen YS, Ko WJ, Chang CY, Young TH and Chang KC. Prevention of arterial stiffening by using low-dose atorvastatin in diabetes is associated with decreased malondialdehyde. *PlosOne*. 2014;9(3): e90471
- Westover MB, Bianchi MT, Eckman MH and Greenberg SM. Statin use following intracerebral haemorrhage a decision analysis. *Arch Neurol*. 2011; 68(5):573-579.
- William RM, Zipfel WR and Webb WW. Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils. *Biophys J*. 2005; 88(2):1377-86.
- Zemankova L, Varejckova M, Dolezalova E, Fikrova P, Jezkova K, Rathouska J, Cerveny L, Botella LM, Bernabeu C, Nemeckova I and Nachtigal P. Atorvastatin-induced endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells is mediated by endoglin. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(3):403-413.
- Zipfel WR, Williams RM and Webb WW. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotech*. 2003;21(11), 1369-1377.

2. DISCUSSION

L'objectif de ce travail était d'évaluer les modifications apportées par un traitement précoce à faible dose d'atorvastatine sur la fonction vasculaire. Afin de vérifier le caractère non-hypolipidémiant du traitement utilisé, des mesures des concentrations sériques en LDL, HDL et triglycérides ont été réalisées tous les mois. Il est à noter que les concentrations mesurées présentent des valeurs similaires à celles observées chez le lapin Watanabe [Kobayashi *et al.*, 2011]. Par ailleurs, aucun effet du traitement n'est observé sur les concentrations en triglycérides, LDL ou HDL. En conséquence, la dose de statine utilisée peut être considérée comme une faible dose non hypolipidémiante. De plus, afin d'être certain que les résultats obtenus et surtout les différences observées ne puissent pas être imputables à des variations de longueur de l'aorte dans le temps, ce paramètre a été mesuré chez chaque animal. Aucune différence significative de longueur n'a été observée chez nos animaux entre 3 et 12 mois. De même, le traitement n'a eu aucun effet sur ce paramètre. Il nous est donc possible de comparer tous les groupes entre eux au niveau des différentes mesures réalisées.

La fonction vasculaire a tout d'abord été évaluée *in vivo* par la mesure de la vitesse de l'onde de pouls, utilisée comme indicateur de l'élasticité vasculaire [Laurent *et al.*, 2006]. Il apparaît que celle-ci augmente avec l'âge et/ou le développement de l'athérosclérose chez les animaux contrôles alors qu'elle reste stable sur toute la durée de l'expérimentation chez les animaux traités. Nous observons donc une rigidification des artères au cours du temps chez nos animaux contrôles. Cette rigidification est inhibée par le traitement. La fréquence cardiaque et

les pressions sanguines ne sont pourtant pas différentes à 12 mois, là où l'écart entre contrôles et traités est le plus grand en ce qui concerne la vitesse de l'onde de pouls. La vitesse de l'onde de pouls étant un indicateur validé du risque cardiovasculaire [Vlachopoulos *et al.*, 2010], les résultats indiquent donc que même sans effet hypolipidémiant notable, la statine, par ses effets pléiotropes, limite le risque cardiovasculaire.

Les différences observées *in vivo* pourraient se rapporter à des modifications fonctionnelles ou structurelles. L'aspect fonctionnel a tout d'abord été évalué à l'aide d'anneaux vasculaires isolés. La statine peut en effet avoir des effets sur la dysfonction endothéliale et la voie du NO [Cheng *et al.*, 2013 ; Zemankova *et al.*, 2015], ce qui peut engendrer des modifications de la vasorelaxation, et ce, dans différents territoires [Gong *et al.*, 2014 ; Sander *et al.*, 2005 ; Giannopoulos *et al.*, 2012, Holowatz *et al.*, 2011]. Trois zones ont été étudiées, deux de gros calibre (aorte et carotide) et une de petit calibre (artère mésentérique). La vasorelaxation peut être endothélium-dépendante, ce qui a été évalué par des doses croissantes d'acétylcholine ; ou endothélium-indépendante, ce qui a été évalué grâce à l'action du nitroprussiate de sodium. Dans cette étude, les vaisseaux de gros calibre ne présentent pas de modification dans le temps ou avec le traitement au niveau de leur fonction endothéliale ou de l'activité de leurs cellules musculaires lisses. Le seul effet observé concerne l'artère mésentérique qui ne répond plus aux stimulations de l'acétylcholine (signe d'une dysfonction endothéliale) à 12 mois chez les animaux contrôles alors que la réponse est maintenue chez les individus traités du même âge.

La vitesse de l'onde de pouls dépendant de l'élasticité des gros vaisseaux, nous pouvons conclure que les différences observées au niveau de la vitesse de l'onde de pouls ne sont pas liées à une modification de la réactivité vasculaire de ces

derniers. La composante structurelle a donc été testée. Pour cela, un test de traction statique a été mené sur des portions d'aorte. Au préalable les échantillons ont été mesurés et il n'apparaît pas de différence d'épaisseur de paroi entre les différentes aortes. La première phase de déformation (linéaire) a été étudiée par le calcul de son module d'Young. Il apparaît qu'au cours du temps, il y a une perte d'élasticité des artères chez les animaux contrôles. Cette perte d'élasticité est moindre chez les animaux traités avec une différence significative entre les deux groupes à douze mois. Cet effet protecteur des statines sur l'élasticité a déjà été mentionné pour des concentrations non-hypocholestérolémiantes [Lunder *et al.*, 2011] et semble dose dépendante puisqu'il n'est pas retrouvé avec de fortes doses [Ballard *et al.*, 2014]. Il apparaît ici qu'un traitement à faible dose d'atorvastatine apporte des effets protecteurs au système vasculaire qui ne sont pas forcément retrouvés lors de l'utilisation de doses plus importantes. Reste à déterminer si cette modification d'élasticité repose sur une différence de composition ou d'organisation tridimensionnelle de ces éléments constitutifs. Le comportement élastique des artères repose sur différents composants constitutifs dont les deux plus importants sont le collagène et l'élastine [Assoul *et al.*, 2008]. Chez notre modèle, il a été montré qu'il existe une tendance à la diminution du contenu en élastine avec l'âge (depuis 100mg/g d'élastine insoluble à 6 mois jusqu'à 60mg/g à l'âge de 30 mois) [Dalessandri *et al.*, 1994]. Nous avons quantifié le collagène en microscopie à deux photons et en génération de seconde harmonique et l'élastine en autofluorescence. Le collagène ne semble pas modifié par le traitement, cet élément n'est donc pas responsable de la modification d'élasticité constatée à 12 mois entre contrôles et traités, à moins que ce soit le type de collagène ou l'orientation de ses fibres qui ait été modifié [Karimi *et al.*, 2015]. En ce qui concerne l'élastine, une plus grande

proportion est observée chez les individus traités. Ce résultat pourrait être une conséquence de l'augmentation de la synthèse d'élastine par le traitement mais nous avons vu dans l'introduction que cette synthèse était faible. En revanche, il paraît plus probable que le traitement limite la diminution de la proportion relative d'élastine dans les artères. En effet avec l'âge, l'élastine est dégradée par des protéases et le traitement, de par son effet pléiotrope anti-inflammatoire pourrait modifier l'expression de ces protéases. Par ailleurs, nous sommes en présence d'un modèle développant spontanément de l'athérosclérose. Cette pathologie crée une augmentation et une migration de cellules musculaires lisses [Ip *et al.*, 1990]. Dans le cas des individus contrôles, Il peut alors être constaté une plus faible proportion relative d'élastine liée à la présence d'une plus grande quantité de cellules musculaires lisses. Cet effet de l'athérosclérose pourrait être limité par le traitement. En effet, il a été mis en évidence que plusieurs statines pouvaient réduire le nombre de cellules musculaires lisses [Fukumoto *et al.*, 2001].

Les deux premiers chapitres de ce travail ont permis de montrer que le traitement a des effets sur le développement de l'athérosclérose et la fonction vasculaire. Afin de déterminer les mécanismes potentiellement impliqués, nous nous intéresserons, au chapitre 3, aux processus inflammatoires et à certains paramètres de l'adhésion.

CHAPITRE 3 :
Suivi des paramètres de l'inflammation
et de l'adhésion

1. INTRODUCTION

Dans les chapitres précédents, nous avons vu que le traitement proposé pouvait non seulement modifier l'évolution et la sévérité des plaques mais aussi modifier l'élasticité vasculaire. Une des pistes de réflexion sur l'origine de ces modifications pourrait être la modification de certains paramètres de l'inflammation. En effet, le développement des plaques d'athérome repose en grande partie sur des phénomènes inflammatoires [Ross. 1999].

Ainsi, l'athérosclérose commence par l'activation de l'endothélium *via* les LDL oxydés, l'attraction et la diapédèse des monocytes et des lymphocytes T circulants dans l'intima. Une production de cytokines pro- et anti-inflammatoires, de protéases matricielles (qui peuvent dégrader les protéines de structures comme le collagène et surtout l'élastine) et enfin l'induction de l'apoptose conduisant à la formation d'un noyau lipidique nécrotique sont ensuite observées. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons tout particulièrement aux facteurs de l'inflammation et de l'adhésion, leur évolution dans le temps ainsi qu'aux éventuelles modifications apportées par le traitement pour développer une approche plus mécanistique des éléments précédemment évoqués dans ce manuscrit.

Il est communément accepté que l'extravasation et l'oxydation des LDL dans l'espace sous-endothélial constitue le point de départ de la formation des plaques d'athérome. Le LDL peut être présent soit sous forme de LDLox dans la circulation et être internalisé *via* des récepteurs spécifiques au niveau de l'endothélium [Sawamura *et al.*, 1997] soit sous forme de LDL non oxydés. Ces derniers vont infiltrer l'endothélium et être oxydés en plusieurs étapes dans l'espace sous endothélial. Tout d'abord, ils subissent une peroxydation limitée qui peut être initialisée par la

présence de malondialdéhyde ou de radicaux libres [Chisolm *et al.*, 1999]. Par la suite, la phospholipase A2 va étendre le phénomène de peroxydation lipidique [Li & Cathcart, 1997]. La fragmentation des acides gras polyinsaturés qui s'en suit conduit à la production d'aldéhyde et de cétone. Les cétones sont alors éliminées alors que les aldéhydes vont se lier aux résidus lysine de l'apoprotéine B (ApoB) [Tedgui & Mallat, 2001]. La modification conformationnelle de ApoB va empêcher sa reconnaissance par le récepteur au LDL mais il va alors pouvoir se lier aux récepteurs scavengers [Henriksen *et al.*, 1981 ; Henriksen *et al.*, 1983]. L'infiltration et l'oxydation du LDL dans la paroi vasculaire va favoriser l'activation du complément et des cellules endothéliales [Bhakdi *et al.*, 1995]. Les cellules endothéliales activées vont alors exprimer à leur surface plusieurs molécules d'adhésion à destination des leucocytes, ainsi que des chimiokines qui vont permettre aux leucocytes de rouler et d'adhérer à la paroi vasculaire [Lehr *et al.*, 1993 ; Cushing *et al.*, 1990].

Les molécules d'adhésion sont exprimées à la surface des cellules endothéliales et vont permettre l'arrêt de cellules circulantes et leur adhésion à la surface du vaisseau. La présence de LDL en sous-endothélial va en particulier stimuler la synthèse de MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) [Klouche *et al.*, 2000]. Le LDL oxydé peut lui aussi favoriser son expression au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses [Charo & Ransohoff, 2006]. Enfin, il est à noter que MCP-1 peut aussi être synthétisée par les macrophages présents dans la plaque d'athérome. MCP-1 semble jouer un rôle capital dans le développement de l'athérosclérose puisqu'une déficience en cette chémokine [Gosling *et al.*, 1999] ou en son récepteur [Boring *et al.*, 1998], limite de façon drastique la surface aortique occupée par les plaques. De plus, l'analyse de lésions chez l'homme (carotide, aorte) comme chez le lapin (aorte) a permis de mettre en

évidence cette MCP-1 dans les plaques, notamment au niveau des zones riches en macrophages, ce qui tend à prouver l'implication de MCP-1 dans le recrutement des monocytes/macrophages [Nelken *et al.*, 1991 ; Yla-Herttuala *et al.*, 1991]. Cette chémokine est en effet notamment impliquée dans l'infiltration de monocytes adhérents à l'endothélium dans la paroi vasculaire (figure 21) et dans le développement de lésions athéromateuses [Gu *et al.*, 1998 ; Gosling *et al.*, 1999]. Les monocytes circulants sont les précurseurs des macrophages de la plaque puis des cellules spumeuses des lésions athéromateuses et lorsque la prolifération et la maturation des macrophages sont bloquées par une déficience en M-CSF (facteur de croissance produit par les cellules endothéliales et les CML), on observe une résistance au développement de l'athérosclérose chez le modèle souris [Smith *et al.*, 1995].

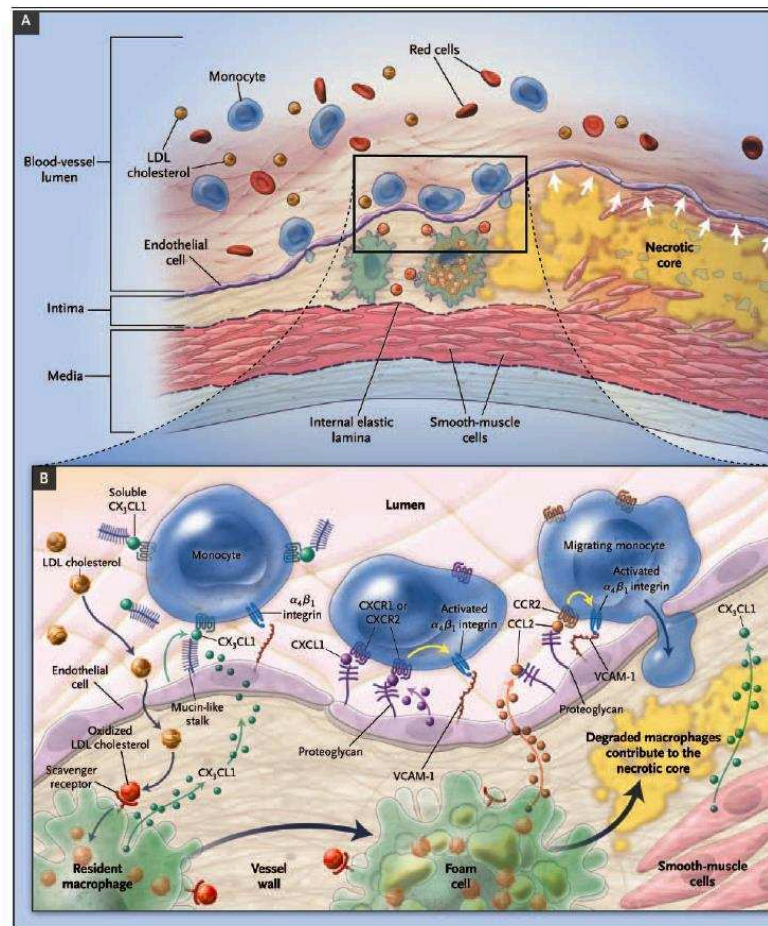


Figure 21 : attraction des macrophages dans la paroi vasculaire (Charo & Ransohoff, 2006).

L'initialisation de la pathologie est également associée à la présence de P-sélectine co-localisée avec ICAM-1 [Johnson-Tidey *et al.*, 1994] et VCAM-1 qui permettent l'adhésion des monocytes circulants au niveau des zones de forte susceptibilité au développement de l'athérosclérose dans l'arbre artériel [Nakashima *et al.*, 1998]. La présence de LDL oxydé favorise l'expression de VCAM-1 à la surface de l'endothélium [Khan *et al.*, 1995]. Après l'adhésion des monocytes (grâce en partie à VCAM-1) la migration trans-endothéliale de ceux-ci va être possible par l'action notamment de PECAM-1 (CD31) et avec le concours de NF- κ B [Muller *et al.*, 1993 ; Harry *et al.*, 2008]. Les monocytes circulants peuvent donc se fixer à

l'endothélium *via* les molécules d'adhésion et se différencier en macrophages dans l'espace sous endothélial. Les macrophages vont ensuite phagocyter des corps nécrotiques, apoptotiques ou des pathogènes *via* des récepteurs « éboueurs » (ou « scavenger ») comme SR-AI, SR-AII, CD36 ou CD68 [Suzuki *et al.*, 1997 ; Podrez *et al.*, 2000]. Dans le cadre de l'athérosclérose, les macrophages vont pénétrer sous l'endothélium et aller phagocyter notamment les LDL oxydés. Contrairement aux récepteurs aux LDL [Brown & Goldstein, 1983], les récepteurs scavenger qui reconnaissent les LDL oxydés comme les récepteurs SRA (Figure 22) n'ont pas de rétrocontrôle négatif lié au contenu intra-cellulaire en cholestérol [de Winther *et al.*, 2000], les macrophages vont donc internaliser les LDLox jusqu'à devenir cellules spumeuses (Figure 23). Lorsque le LDLox entre en contact avec le récepteur scavenger d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) comme le macrophage, il est complexé avec des produits de peroxydation lipidique (comme le MDA) et protéolysé dans le lysosome. Les fragments peptidiques obtenus s'associent aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II), sont exposés à la surface des CPA et reconnus par les récepteurs TCR des lymphocytes T [Nicoletti *et al.*, 1999]. Des récepteurs TLR (toll-like receptors) comme le TLR1, TLR2 et TLR4 peuvent également être impliqués dans le développement des plaques d'athérome [Edfeldt *et al.*, 2002]. Ces récepteurs sont exprimés au niveau des macrophages mais également des lymphocytes et des cellules vasculaires et sont impliqués dans la réaction inflammatoire [Janeway & Medzhitov, 2002]. En effet, cette famille de récepteurs peut entrer en jeu dans les pathologies cardiovasculaires en liant le LDLox [XU *et al.*, 2001] et en activant la voie du NF- κ B et l'expression de E-selectine, VCAM-1 et ICAM-1 [de Kleijn & Pasterkamp, 2003 ; Janeway & Medzhitov, 2002].

Les macrophages participent aussi à la déstabilisation de la plaque par la sécrétion de radicaux libres oxygénés et de métalloprotéases matricielles. Il a en effet été démontré que les plaques présentant une rupture sont significativement plus riches en macrophage que les plaques stables ou à chape fibreuse fine (<65µm) et vulnérable [Virmani *et al.*, 2005 ; Kolodgie *et al.*, 2000]. Les phénomènes d'oxydation vont toucher les lipides mais aussi d'autres composants cellulaires ou extracellulaires qui peuvent alors avoir une grande homologie avec des PAMP (Patterns moléculaires associés aux pathogènes) exogènes vis-à-vis de récepteurs des macrophages spécifiques de l'immunité innée (PRR comprenant les RS et les TLR) [Pirault & Lesnik, 2011]. Ceci va favoriser une réponse inflammatoire mimant une infection exogène et/ou saturer les récepteurs des macrophages et favoriser le développement du centre nécrotique.

Enfin, on assiste à la mise en place d'une réaction inflammatoire chronique. En effet, il s'établit un cercle vicieux où des macrophages (présents dans la paroi pour éliminer le cholestérol présents en excès) vont activer les cellules endothéliales et augmenter la perméabilité aux LDL par la production de cytokines pro-inflammatoires qui vont pouvoir activer également d'autres types cellulaires comme les lymphocytes T CD4⁺ [Ait-Oufella *et al.*, 2008].

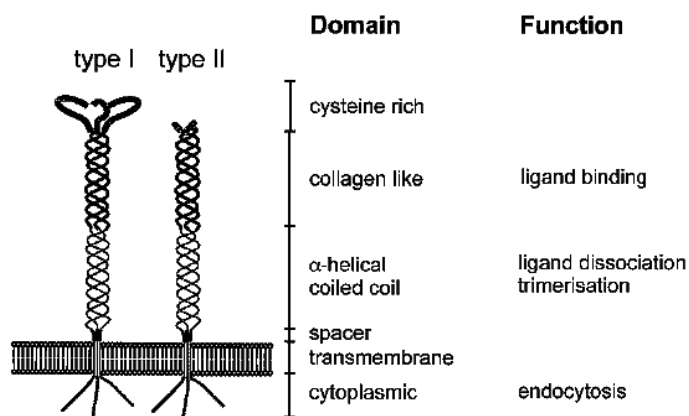


Figure 22 : structure des récepteurs scavenger SRA de type I et II (de Winther *et al.*, 2000).

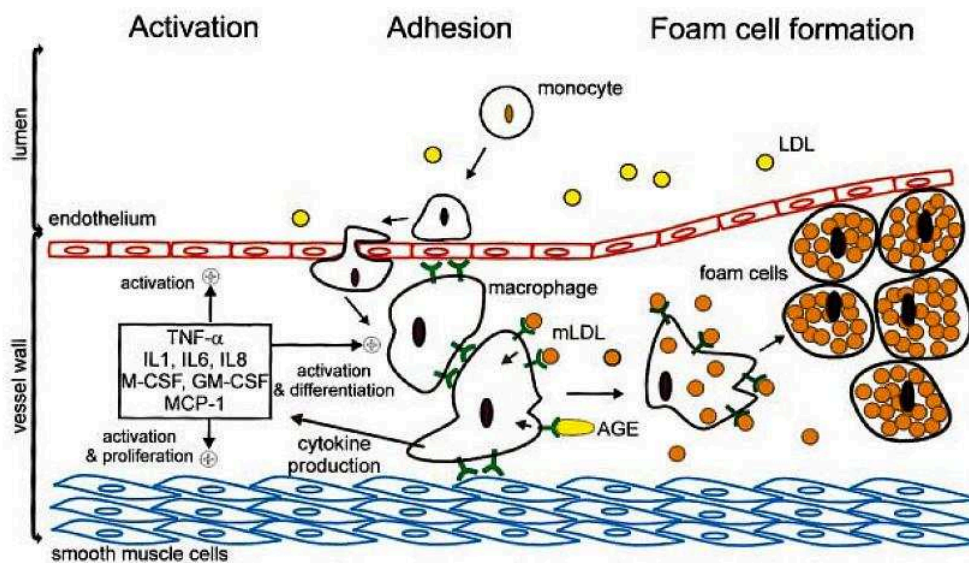
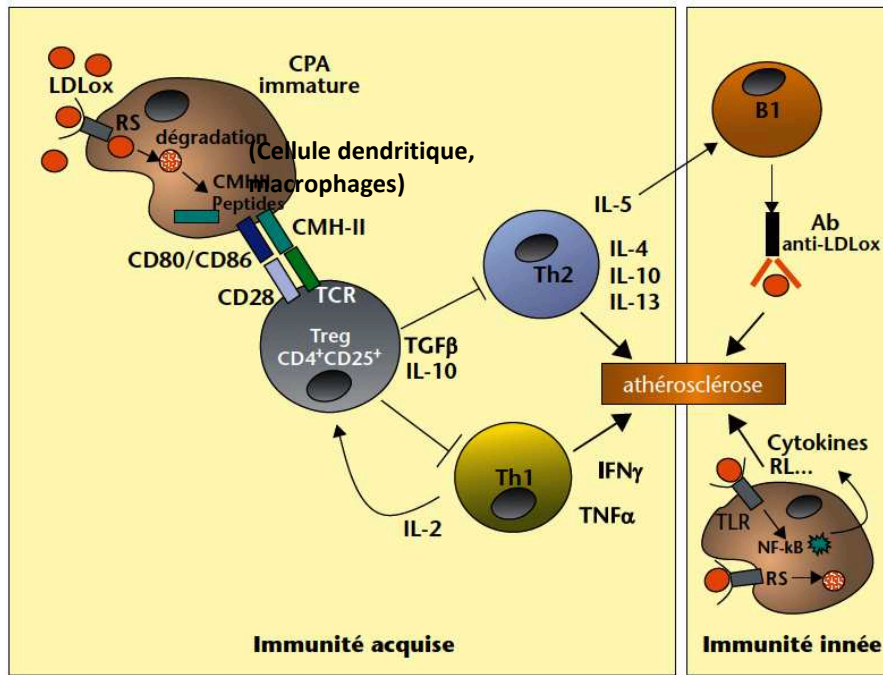


Figure 23 : internalisation des LDL modifiés (mLDL) par les macrophages et développement des cellules spumeuses en vert les récepteurs scavenger SRA (de Winther et al., 2000).

Les macrophages font partie de l'immunité innée mais l'immunité adaptative va aussi entrer en jeu dans les phénomènes inflammatoires de l'athérosclérose (Figure 24). En plus des macrophages, d'autres types cellulaires comme les lymphocytes ou les cellules dendritiques activées vont entrer en jeu [Pirault & Lesnik, 2011]. En effet, les lymphocytes T et B sont importants dans le développement de la pathologie puisque en cas de déficience de ces types cellulaires chez la souris apoE^{-/-}, la taille des lésions diminue de façon drastique. Une réinjection de lymphocytes T CD4⁺ peut réaugmenter la taille des lésions [Zhou et al., 2000]. De plus, les lymphocytes T CD4⁺ sont présents à hauteur de 10 à 20 % de la population cellulaire totale dans les stades précoces de la pathologie [Ait-Oufella et al., 2008]. Ainsi, il a été démontré que la présence de T CD4⁺ était fortement liée au développement des plaques d'athérome. Les lymphocytes présents au niveau de la

plaque reconnaissent le LDLox [Stemme *et al.*, 1995] et leur présence conduit notamment à une augmentation de la cytokine interféron γ [Zhou *et al.*, 2000]. Dans les lymphocytes T il faut cependant faire la distinction entre les Th1 pro-inflammatoires et les Th2 anti-inflammatoires qui assurent leurs fonctions en émettant leurs cytokines respectifs [Liblau *et al.*, 1995]. Le recrutement des Th1 est pro-athérogène et médié, entre autre, par P-selectine et E-selectine [Astrup *et al.*, 1997]. Lorsque la réponse Th1 n'arrive pas à contrôler la maladie, il peut être observé une maturation des lymphocytes B afin de limiter les dommages inflammatoires [Taylor-Robinson & Phillips, 1994]. Les cellules B de souris âgées peuvent alors protéger des individus jeunes à risque de développer la pathologie de façon sévère alors que les cellules B de sujets n'ayant pas encore développés la pathologie n'ont pas cette capacité [Caligiuri *et al.*, 2002]. Les lymphocytes T-reg eux aussi peuvent intervenir dans le développement de l'athérosclérose. En effet, l'expression des T-reg limite la progression de l'athérosclérose, l'accumulation de macrophages et de lymphocytes T dans les plaques d'athérome, tout en augmentant la production d'IL10 [Mallat *et al.*, 2003] et en réduisant la synthèse d'interféron. Enfin les lymphocytes Natural Killer (NK) ont également un effet pro-athérogène [Whitman *et al.*, 2004 ; Nakai *et al.*, 2004].

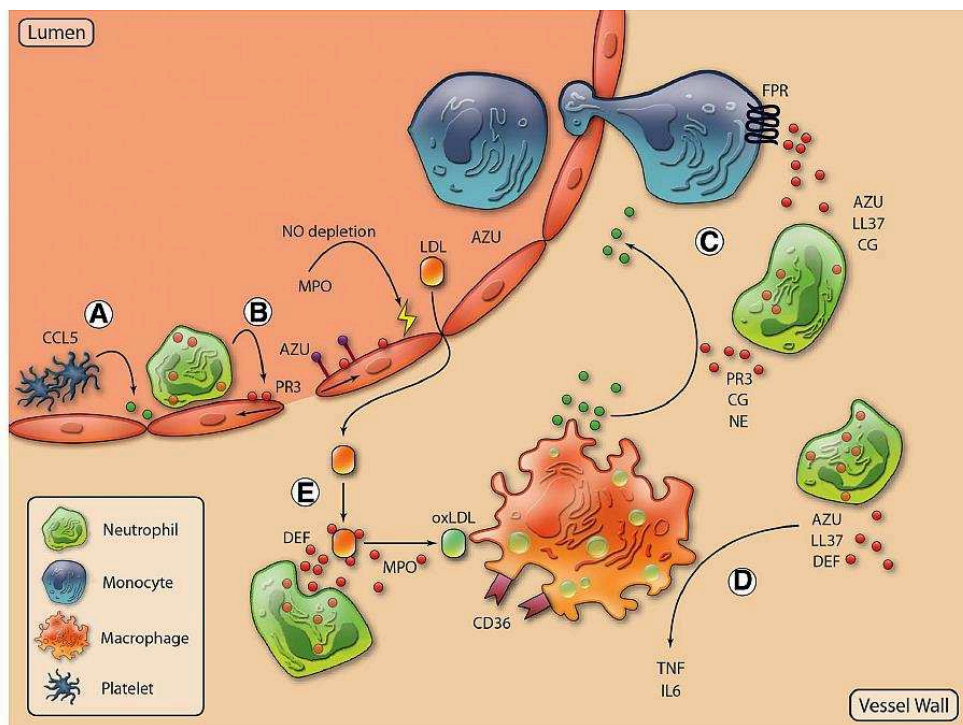


Immunité innée et acquise et inflammation dans l'athérosclérose (adapté de A. Tedgui et Z. Mallat, *Physiol Rev* 2006). Les LDLox déclenchent les réactions immunitaires innées et acquises respectivement à travers la production d'anticorps naturels et l'activation des macrophages d'une part, et la mobilisation des Treg par leur interaction avec les CPA (cellules dendritiques et macrophages essentiellement), d'autre part. Les CPA trafiquent entre la paroi où elles rencontrent les LDLox, et les tissus lymphoïdes où elles participent à la maintenance des Treg. Les CPA immatures ayant internalisé les LDLox présentent les antigènes aux Treg qui à travers la production d'IL-2 et de cytokines immunosuppressives contrôlent la réponse Th1/Th2 : c'est la tolérance immunitaire. En situation pathologique, à la suite d'un trafic permanent entre paroi et tissus lymphoïdes, les CPA deviennent matures interagissent avec les cellules T CD4+ (interaction non montrée ici) ce qui modifie la réponse Th1/Th2 (libération de cytokines) que tentent de contrôler les Treg par la production de TGFβ et d'IL-10 et d'IL-5. C'est probablement la perte de ce contrôle qui conduit à l'exacerbation de la réaction inflammatoire dans la paroi.

Figure 24 : Implication de l'immunité innée et acquise dans l'athérosclérose (Nalbone et al., 2006).

Il a pu être établi une corrélation entre un nombre de leucocytes circulant important et un risque accru d'infarctus du myocarde [Friedman et al., 1974]. Cette augmentation des leucocytes est majoritairement due aux neutrophiles circulants qui sont également activés [Biasucci et al., 1996]. Ces neutrophiles sont impliqués dans la pathologie athéromateuse (Figure 25) et s'accumulent dans les plaques compliquées comme cela a pu être mis en évidence chez des patients présentant des symptômes coronariens aigus [Naruko et al., 2002]. En effet, les neutrophiles sont des molécules pro-inflammatoires qui aggravent la dysfonction endothéliale,

favorisant le recrutement et l'activation des macrophages mais aussi contribuant à la déstabilisation de la plaque [Soehnlein, 2012].



Neutrophils feed mechanisms of atherogenesis. A, Neutrophils are recruited to the atherosclerotic lesion in a partially platelet-dependent manner. These deposit C-C motif chemokine ligand (CCL)5, which activates neutrophils via CCR1 and CCR5, thereby promoting firm adhesion. B, Activated neutrophils secrete granule proteins such as myeloperoxidase, azurocidin, and proteinase-3, which induce expression of adhesion molecules and permeability changes and limit the bioavailability of nitric oxide, altogether aggravating endothelial dysfunction. C, Granule proteins deposited on the endothelium and secreted at the site of inflammation induce adhesion and recruitment of inflammatory monocytes involving formyl-peptide receptors. Proteolytic modification of chemokines enhances their ability to attract monocytes. D, Neutrophil granule proteins promote macrophage polarization toward a proinflammatory M1 phenotype and induce expression of scavenger receptors (eg, CD36). E, Binding of α -defensins to low-density lipoprotein (LDL) traps LDL in the vessel wall. Oxidation of LDL through myeloperoxidase-dependent mechanisms enhances foam cell formation. AZU, azurocidin; CG, cathepsin G; DEF, α -defensins; FPR, formyl-peptide receptor; MPO, myeloperoxidase; NE, neutrophil elastase; PR3, proteinase-3. Illustration credit: Cosmocyte/Ben Smith.

Figure 25 : Implication des neutrophiles dans le développement de l'athérosclérose (Soehnlein, 2012).

Différents types cellulaires (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B, Lymphocytes T et T helper) sont donc impliqués dans le développement de l'inflammation liée à l'athérosclérose. La communication entre ces cellules est indispensable à la mise en place et l'évolution des processus inflammatoires, ainsi la modification de l'expression de ces messagers (cytokines) peut refléter ou modifier la sévérité de la pathologie (Tableau 8).

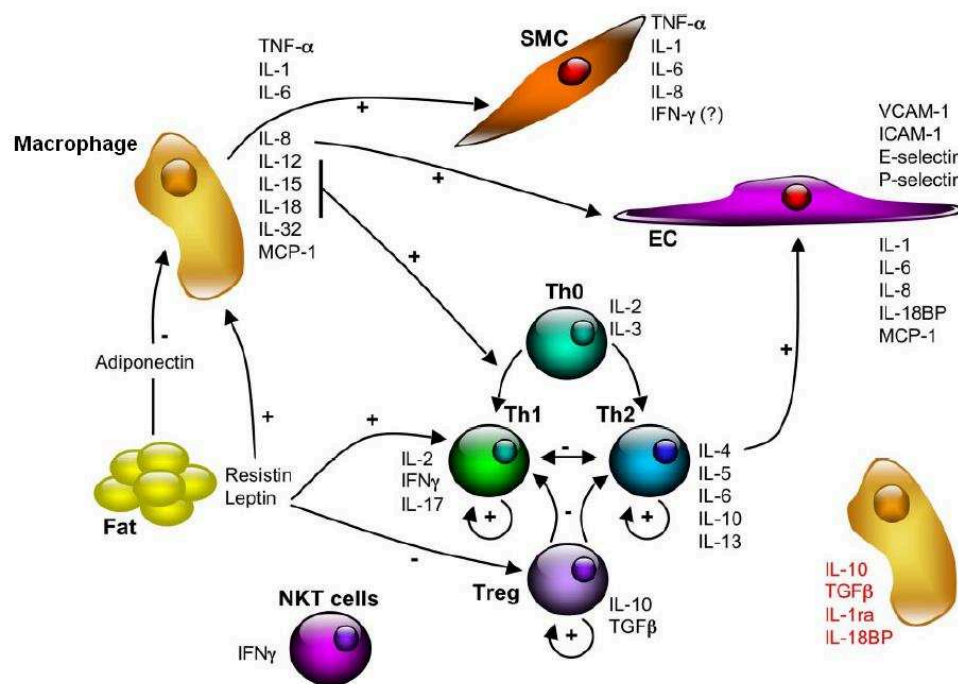
Cytokine	Age(w)	Sex	Chol.	Lesion Size	Mac	T Cells	SMC	Collagen	Reference Nos.
IL-1β									
IL-1β ^{-/-} apoE ^{-/-}	12	?	NC	-33%	ND	ND	ND	ND	342
IL-1β ^{-/-} apoE ^{-/-}	24	?	NC	-32%	ND	ND	ND	ND	342
IL-1ra									
IL-1ra ^{+/-} apoE ^{-/-}	16	M	NC	+30%	NC	ND	NC	ND	307
IL-1ra ^{+/-} apoE ^{-/-}	32	M	NC	NC	+90%	ND	-15%	ND	307
TgIL-1raxLDLr ^{-/-} HFD	14(4 + 10)	?	+40%	NC	NC	ND	ND	ND	169
IL-1ra ^{-/-} (cholate)	16(4 + 12)	?	-25%	+50%	ND	ND	ND	ND	169
IL-1ra ^{-/-} (cholate)	16(4 + 12)	?	-60%	+180%	ND	ND	ND	ND	169
RelL-1ra>apoE ^{-/-}	12	M/F	NC	-74%/-56%	ND	ND	ND	ND	189
TgIL-1raxapoE ^{-/-} HFD	20(10 + 10)	M	+70%	-53%	ND	ND	ND	ND	462
TgicIL-1raxapoE ^{-/-} HFD	20(10 + 10)	M	+90%	-67%	ND	ND	ND	ND	462
IL-2									
RecIL-2>apoE ^{-/-}	?	?	?	+24%	?	?	?	?	685
Anti-IL-2>apoE ^{-/-}	?	?	?	-43%	?	?	?	?	685
IL-4									
IL-4 ^{-/-} (cholate)	20(5 + 15)	F	NC	NC	NC	NC	ND	ND	227
IL-4 ^{-/-} apoE ^{-/-}	30	M/F	NC	-34%/-23%	NC	NC	ND	ND	156
IL-4 ^{-/-} apoE ^{-/-}	45	M/F	NC	NC/NC	NC	NC	ND	ND	156
BMT IL-4 ^{-/-} >LDLr ^{-/-}	46(42 + 4)	F	NC	NC(AS)	NC	NC	ND	ND	340
				-67%(aorta)					
IL-5									
BMT IL-5 ^{-/-} >LDLr ^{-/-}	28(12 + 16)	F	NC	+18%(AS)	ND	ND	ND	ND	53
				+54%(aorta)					
IL-6									
RecIL-6>C57BL6	24(3 + 21)	M	NC	+400%	ND	ND	ND	ND	294
RecIL-6>apoE ^{-/-}	9(3 + 6)	M	NC	+89%	ND	ND	ND	ND	294
RecIL-6>apoE ^{-/-}	24	M	NC	+138%	ND	ND	ND	ND	294
IL-6 ^{-/-} apoE ^{-/-}	53	F	NC	+85%	ND	ND	ND	ND	187
IL-6 ^{-/-} apoE ^{-/-}	53 ± 4	M	+64%	+87%(aorta)	-67%	-50%	ND	-20%	598
IL-9									
RecIL-9 > LDLr ^{-/-}	?	?	NC	-65%	ND	ND	ND	ND	359
IL-10									
IL-10 ^{-/-} (C57BL6) (cholate)	24(8 + 16)	F	NC	+200%(SPF)	ND	ND	ND	ND	434
				+3000%(CONV)	NC	+350%	ND	-75%	434
IL-10 ^{-/-} (C57BL6) (cholate)	15	?	NC	+150%(SPF)	ND	ND	ND	ND	542
IL-10TgC57BL6 (cholate)	15	?	NC	-60%	ND	ND	ND	ND	542
IL-10 ^{-/-} apoE ^{-/-}	16	M/F	NC	NC/+180%	NC	NC	NC	ND	104
IL-10 ^{-/-} apoE ^{-/-}	48	M/F	NC	NC/NC	NC	NC	NC	ND	104
BMT IL10Tg>LDLr ^{-/-}	30(10 + 20)	M	NC	-47%	+50%	No T cell	ND	+30%	541
BMT IL-10 ^{-/-} >LDLr ^{-/-}	32(18 + 14)	F	NC	+35%	+61%	+116%	NC	-40%	548
AdIL-10syst>LDLr ^{-/-}	20(12 + 8)	F	-40%	-56%	-	ND	ND	ND	708
AdIL-10local>LDLr ^{-/-}	20(12 + 8)	F	NC	-50%	-	ND	ND	ND	708
AdIL-10>apoE ^{-/-}	13	M	NC	-61%	NC	+80%	No SMC	NC	488
IL-12									
IL-12 ^{-/-} apoE ^{-/-}	30	M/F	NC	-48%/-50%	-40%	NC	ND	ND	156
IL-12 ^{-/-} apoE ^{-/-}	45	M/F	NC	NC/NC	NC	NC	ND	ND	156
RecIL-12>apoE ^{-/-}	21	M	NC	+100%	ND	+	ND	ND	377
Apobec1 ^{-/-} LDLr ^{-/-} 12/15Lox ^{-/-}	15	M/F	NC	-39%/NC	ND	ND	ND	ND	786
(IL-12 deficient)	34	M/F	NC	-43%/-48%	ND	ND	ND	ND	786
IL-18									
IL-18 ^{-/-} xapoE ^{-/-}	24	M	+50%	-35%	-	-38%	+160%	ND	188
RecIL18bp>apoE ^{-/-}	23	M	NC	-25%	-50%	-67%	+100%	+85%	436
RecIL-18>apoE ^{-/-}	16	M	NC	+120%	+	+350%	ND	ND	735
RecIL-18>apoE ^{-/-} /IFN ^{-/-}	16	M	NC	NC	ND	NC	ND	ND	735
AdIL-18>apoE ^{-/-} (carotid collar model)	18	F	NC	NC	-23%	ND	NC	-44%	167
RecIL-18>apoE ^{-/-} /SCID	14	F	NC	+187%	+	ND	NC	ND	672
TNF-α									
TNF-α ^{-/-} (cholate)	22(6 + 16)	F	+46%	NC	ND	ND	ND	ND	614
TNFRp55 ^{-/-} (cholate)	24(6 + 18)	F	NC	+130%	ND	ND	ND	ND	613, 614
TNFRp75 ^{-/-} (cholate)	24(6 + 18)	F	NC	NC	ND	ND	ND	ND	614
TNFR p55 ^{-/-} /p75 ^{-/-} (cholate)	24(6 + 18)	F	NC	+130%	ND	ND	ND	ND	614
TNFRp>apoE ^{-/-} HFD	13(8 + 5)	M/F	NC/NC	NC/-30%	NC	ND	NC	ND	189
TmTNF×C5BL/6 (cholate)	29(9 + 20)	M	NC	-44%	-	ND	+	ND	107
TNF-α ^{-/-} diet	29(9 + 20)	M	NC	-94%	-	ND	ND	ND	107
TNF-α ^{-/-} apoE ^{-/-} HFD	14(4 + 10)	?	+40%(NS)	-50%(aorta)	NC	-50%(NS)	ND	ND	83
TNF-α ^{-/-} apoE ^{-/-} HFD	44(4 + 40)	?	NC	-60%(aorta)	NC	-50%(NS)	ND	ND	83
rec sTNFR1>apoE ^{-/-}	32(7 + 25)	M	+62%(NS)	-75%	NC	+240%	ND	ND	83
BMT TNF>apoE HFD	35(10 + 25)	M > F	NC	-83%	ND	ND	ND	ND	83
TNF-α ^{-/-} apoE ^{-/-}	12	M/F	NC/NC	-20%/-32%	ND	ND	ND	ND	515
TNF ^{-/-} apoE*3Leiden HFD	28(8 + 20)	F	NC	NC	NC	NC	NC	NC	67
TNF-β									
Lymphotoxinα ^{-/-} (cholate)	22(6+16)	F	-20%(NS)	-63%	ND	ND	ND	ND	614
IFN-γ									
IFN-γR ^{-/-} xapoE ^{-/-} HFD	17(5 + 12)	F	+	-60%	-	-	ND	+	260
recIFN-γ>apoE ^{-/-} HFD	23(16 + 7)	M	NC	+100%	+	+170%	ND	+	736
IFN-γ ^{-/-} xapoE ^{-/-} HFD		M	NC	-	-	-	ND	-	735
IFN-γ ^{-/-} xapoE ^{-/-} HFD		F	NC	NC	NC	NC	ND	ND	735
INFγ ^{-/-} xLDLr ^{-/-}	8	M/F	NC	-75%	-	-	ND	-(?)	95
INFγ ^{-/-} xLDLr ^{-/-}	20	M/F	NC	-43%	NC	NC	NC	NC	95
BMT IFN-γ ^{-/-} >LDLr ^{-/-} HFD	15(9 + 6)	M/F	NC	+80%	NC	NC	NC	+	507
BMT IFN-γ ^{-/-} >LDLr ^{-/-} HFD	21(9 + 12)	M/F	NC	NC	NC	NC	NC	+	507
TGF-β									
TGF-β1 ^{+/-} (cholate)	20(8 + 12)	F	NC	+500%	+	ND	-	ND	245
AbTGF-β>apoE ^{-/-} HFD	15(6 + 9)	M	NC	+82%	+30%	NC	NC	-54%	438
sTGF-βRII>apoE ^{-/-}	17(5 + 12)	M	NC	NC	-15%	+177%	NC	NC	421
sTGF-βRII>apoE ^{-/-}	29(17 + 12)	M	NC	-37%	NC	+145%	NC	-50%	421
BMT CD2-dnTGF-RII>LDLr ^{-/-}									
- HFD	22(12 + 10)	M	NC	-20%	NC	+75%	-33%	-20%	236
CD2-dnTGF-RIIapoE ^{-/-}	12	F	-26%	+300%	+	+	NC	-	572

NC, no change; ND, not determined; SPF, specific-pathogen free; CONV, conventional environment; Tg, transgenic; ielLra, intracellular IL-1ra; HFD, high-fat diet: in the age column, first is age of animals at death; in parentheses, age at the start of diet + duration of diet. Cholate indicates HFD containing cholate. BMT, bone marrow transplantation: in the age column, first is age of animals at death; in parentheses, age at the start of diet + duration of diet. AS, aortic sinus; NS, not statistically significant; Mac, macrophage.

Tableau 8 : Effet d'une déplétion en cytokines sur l'athérosclérose chez le modèle murin (Tedgui & Mallat, 2006).

Les cytokines sont des protéines de signalisation cellulaire responsables de la communication entre les différentes cellules inflammatoires ; un grand nombre d'entre elles sont impliquées dans l'athérosclérose (Figure 26). Elles commencent à être synthétisées tôt dans le processus de développement des plaques. En effet, la présence de LDL sous l'endothélium favorise par exemple l'expression d'une interleukine pro-inflammatoire retrouvée dans les premiers stades de développement de la pathologie : l'IL6 [Klouche *et al.*, 2000]. Les cytokines sont sécrétées entre autre par les lymphocytes T (IFN- γ et IL2 par Th1 et IL4, IL5, IL10 par Th2) et les macrophages (IL1, IL12, TNF α). Elles vont notamment pouvoir moduler la sécrétion par les cellules endothéliales de MCP-1, VCAM-1 et ICAM-1. Leur rôle est essentiel dans le développement de l'athérosclérose puisqu'une inactivation du récepteur à l'interféron gamma (IFN- γ) par exemple peut stabiliser les lésions et les réduire jusqu'à 60% de leur volume [Gupta *et al.*, 1997]. En effet, IFN- γ , produit par les lymphocytes T activés [Liuzzo *et al.*, 2000], a pour rôle, entre autre, d'activer les macrophages [Shapiro *et al.*, 1990]. L'IFN- γ inhibe également la synthèse de collagène I et III par les CML [Amento *et al.*, 1991], ce qui contribue à la fragilisation de la plaque. Le rôle d'autres interleukines comme l'IL4 est plus difficile à établir. L'IL4 active des facteurs transcriptionnels responsables d'une augmentation d'IL5. L'IL5 réduit la production d'INF- γ lui-même impliqué dans l'augmentation de la pathologie. L'action de l'IL4 est donc en définitive inhibitrice vis-à-vis du développement de l'athérosclérose. En revanche, l'IL4 peut aussi activer les gènes codant VCAM-1 ou MCP-1, qui comme nous l'avons vu sont des molécules d'adhésion favorisant le développement de l'athérosclérose (recrutement des monocytes). De même, TNF α va avoir un effet pro-athérogène puisque son expression favorise l'expression de VCAM-1 [Khan *et al.*, 1995]. Le TNF α ainsi que

l'IL1 ont une action pro-inflammatoire et surtout procoagulante [Bevilacqua *et al.*, 1986] via notamment l'induction du facteur tissulaire [Nawroth & Stern, 1986]. L'IL 10, quant à elle, a un effet anti-athéromateux. Bien que produite par les macrophages, sa présence est inversement corrélée à l'inflammation et à l'apoptose [Arai *et al.*, 1995 ; Cohen *et al.*, 1997]. Les souris invalidées pour l'IL10 développent jusqu'à 30 fois plus de plaques d'athérome que les souris contrôles. De plus, un transfert de gène pour l'IL-10 chez ces souris peut réduire la taille des lésions jusqu'à 60% [Mallat *et al.*, 1999]. L'IL-10 peut également participer à la limitation du développement de la pathologie dans ses premiers stades en limitant la surexpression de NF- κ B, VCAM-1 et ICAM-1 [Potteaux *et al.*, 2006]. Ceci au moins en partie grâce à son action de régulation de la production de TNF α [Opal & DePalo, 2000] et de métalloprotéinases [Lacraz *et al.*, 1995]. Le TGF β a lui aussi des propriétés anti athéromateuses et anti-inflammatoire puisque, chez la souris, en absence de TGF β , le développement de plaques d'athérosclérose est plus important et une diminution du contenu en cellules musculaires lisses et collagènes (stabilisant) est observée [Gojova *et al.*, 2003].



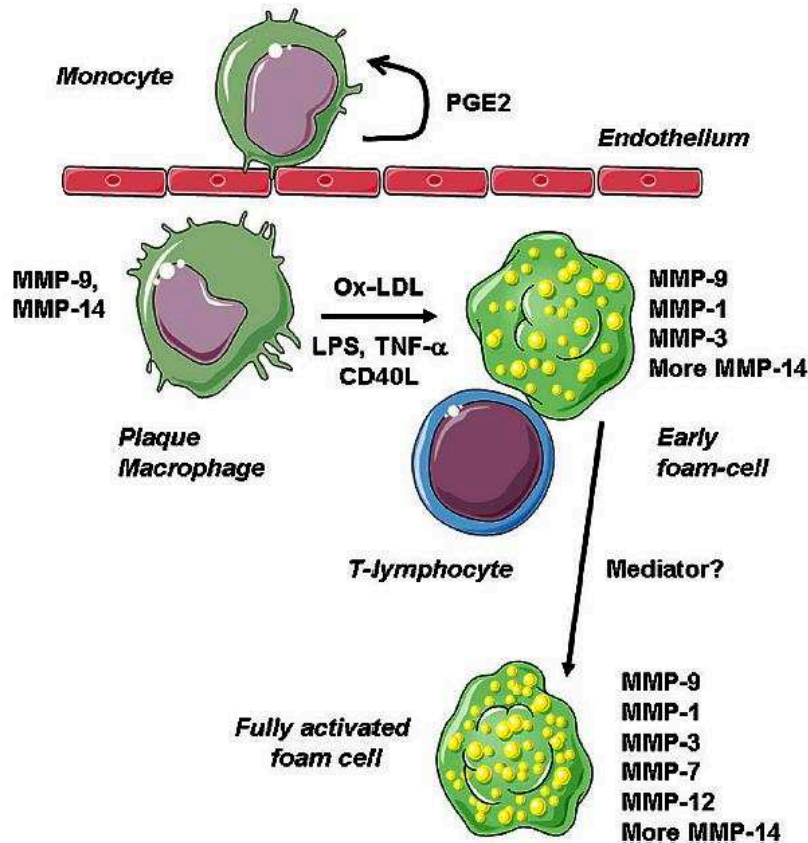
Cytokines involved in atherogenesis. Cytokines are produced by several cell types, including inflammatory and vascular cells, as well as adipocytes. IL-12 and IL-18 produced by macrophages are potent inducers of IFN- γ and promote the differentiation of naive T cells into proatherogenic Th1 cells. Macrophage or macrophage-derived cytokines also activate smooth muscle cells (SMC) and endothelial cells (EC) to produce an array of proinflammatory mediators. On the other hand, the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β , also produced by macrophages, promote antiatherogenic Treg cell differentiation. Other anti-inflammatory mediators with potent antiatherogenic properties include IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) and IL-18 binding protein (IL-18BP). Interestingly, IL-4, the prototype of Th2 cells, has proinflammatory properties on EC. Adipocytes produce both pro- and anti-inflammatory mediators. Leptin activates Th1 cells but inhibits Treg cell function. Adiponectin has been shown to dampen macrophage activation.

Figure 26 : communication entre les différentes cellules inflammatoires impliquées dans l'athérosclérose (d'après Tedgui & Mallat, 2006)

La protéine C-réactive (CRP) est un marqueur plasmatique précoce et transitoire de la réaction inflammatoire. On la retrouve dans le sang des patients souffrant d'angor instable et d'infarctus du myocarde [de Beer *et al.*, 1982]. La CRP pourrait également être impliquée dans l'internalisation des LDL par les macrophages [Zwaka *et al.*, 2001].

Les métalloprotéinases (MMPs) sont des protéases capables de cliver de nombreuses protéines de la MEC ainsi que des protéines à la surface des cellules [Nagase *et al.*, 2006]. Il existe 23 MMPs chez l'homme. Peu exprimées en conditions physiologiques, leur représentation peut être largement modifiée en cas de pathologie cardiovasculaire [Nagase *et al.*, 2006]. Ainsi des cytokines inflammatoires

(TNF α , IL1) [Saren *et al.*, 1996], des facteurs de croissances et des interactions cellule-cellule (*via* notamment VCAM-1 et ICAM-1) peuvent induire une surexpression des MMPs [Nagase & Woessner, 1999]. L'action de régulation conduisant à la diminution de l'expression des MMPs est principalement assurée par les TIMPs (tissue inhibitors of MMPs) [Nagase *et al.*, 2006]. Les MMPs ont également une action sur la vasorelaxation NO-dépendante [Verma *et al.*, 2002]. A l'intérieur de la plaque, les métalloprotéinases sont principalement synthétisées par les monocytes/macrophages (Figure 27). On retrouve une activité des MMPs largement accrue dans les plaques hautement inflammatoires [Choudhary *et al.*, 2006]. Cette surexpression des MMPs peut conduire à un déséquilibre entre dégradation et synthèse de la MEC et ainsi fragiliser la chape fibreuse [Newby, 2005] et favoriser la rupture de plaque. Dans ce contexte, des MMPs impliquées dans la fragilisation de la plaque (MMP-1, MMP-3 et MMP-9 en particulier) [Sluijter *et al.*, 2006 ; Sukhova *et al.*, 1999 ; Galis *et al.*, 1994] peuvent servir de biomarqueurs de risque d'évènement aigu en lien avec l'athérosclérose [Calabro *et al.*, 2009].



Staged up-regulation of MMPs in plaque macrophages. Blood monocytes express low levels of MMPs but up-regulate MMP-9 and MMP-14 on contact with cells and surfaces, probably via prostaglandin E₂ and cyclic adenosine monophosphate. Differentiation to macrophages also up-regulates MMP-9 and MMP-14, which together with pro-MMP-2 from smooth muscle cells, facilitate movement into the intima. Lipopolysaccharide, inflammatory cytokines, CD40L, and oxidized LDL up-regulate MMP-1 and further increase MMP-14. Metalloproteinase 3 is also found in early fatty streaks. Transcription factors NF- κ B and serum amyloid A activating factor 1 are implicated. Metalloproteinases 7 and 12 are up-regulated in deep macrophages of advanced plaques; the pathways responsible are unclear.

Figure 27 : Surexpression des métalloprotéinases (MMPs) au niveau des macrophages intra-plaque (Newby, 2007).

Les processus inflammatoires sont donc indissociables de la formation, du développement et de la vulnérabilité des plaques d'athérome. Nous avons déjà vu qu'un traitement précoce et à faible dose d'atorvastatine pouvait modifier le développement de la pathologie et le fonctionnement du système cardiovasculaire. Une des causes sous-jacentes de ces modifications pouvant être liée à une modification des paramètres de l'inflammation, plusieurs expérimentations ont été réalisées en ce sens. Les différentes étapes de la mise en place de l'inflammation

ont été testées. Tout d'abord, le LDL oxydé, point de départ du développement de l'athérosclérose mais aussi de l'inflammation associée, a été quantifié dans le sérum au cours du temps chez les individus contrôles et traités. Les principaux facteurs d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, MCP-1) responsables de l'adhésion des monocytes à l'endothélium ont également été dosés dans ce compartiment. Les principales cytokines impliquées dans la communication inter-cellulaire dans le cadre de l'athérosclérose (INF γ , TNF α , FT, IL6, IL10) ont aussi fait l'objet de dosages spécifiques sur sérum. Enfin, le marqueur systémique du risque d'accident aigu, la CRP a également été dosée. Au niveau tissulaire, la quantification des macrophages intra-plaques a été réalisée en immunohistochimie sur des plaques de différentes sévérité d'individus contrôles et traités.

Le protocole détaillé ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans **l'article 3**.

Article 3

Effect of a non-hypocholesterolemic atorvastatin treatment on inflammatory parameters during early stages of atherosclerosis: an animal study on WHHL rabbit

Tissier F.¹, Didier R.^{1,3}, Pichavant-Rafini K.¹, Theron M.¹, Bourgeois N.², Desfontis J-C², Mallem Y.², Mansourati J.^{1,3}, Plee-Gautier E⁴ and Gilard M.^{1,3}

Affiliations

¹EA 4324 ORPHY, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, Brest, France

²LUNAM Université, UPSP 5304 de physiopathologie animale et pharmacologie fonctionnelle, Oniris, Nantes, France

³Département de cardiologie, CHRU, Brest, France

⁴Département of biochimie et pharmaco-toxicologie, CHRU, Brest, France

ABSTRACT

In this study, we hypothesised that a non-hypocholesterolemic atorvastatin treatment at long-term has an effect on the inflammatory mechanisms implicated in atherosclerosis development. An atorvastatin treatment (2.5 mg/kg/day) was tested against controls on 34 male 3 to 12 month-old rabbits. This treatment had neither effect on LDL or LDLox circulating levels. The inflammatory state was assessed by the monthly measurements of CRP, IL10, IL-6, TNF α , INF γ , P-selectin, MCP-1, Tissue Factor, ICAM-1 and VCAM-1 blood circulating levels. Except for VCAM-1 and IL-6, no change in concentrations of these parameters was observed in control and treated group. A significant increase in VCAM-1 and IL-6 circulating levels was observed at the 6-9 month period in control group. Atorvastatin intake prevented this

increase. The evolution of atherosclerosis was followed by OCT imaging and the 890 plaques observed were ranked in 4 classes depending on the severity of the lesions. Moreover, the surface occupied by macrophages was determined for each class of plaques. Our results show an evolution of atherosclerosis throughout the experiment in control group. This evolution is delayed by atorvastatin intake. This molecule could act both on macrophage recruitment and smooth muscle cell proliferation.

INTRODUCTION

It is commonly accepted that the atherosclerosis is an inflammatory process and that its evolution occurs hand-in-hand with inflammatory process at each stage of the disease [Ross, 1999]. Briefly, during the first steps of atherosclerosis evolution, the oxidation of LDL retained in the intima leads to the activation of endothelial cells [Bhakdi et al., 1995]. Once activated, these cells express on their surface selective adhesion molecules which bind to different class of leucocytes such as monocytes or T-lymphocytes. Amongst these molecules, MCP-1, P-Selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are implied in white blood cell recruitment and development of atherosclerotic lesions [Johnson-Tidey et al., 1994; Gu et al.,

1998; Nakashima et al., 1998; Gosling et al., 1999]. Then, monocytes and T-lymphocytes migrate into the intima where monocytes differentiate into macrophages and then become foam cells. Macrophages and T-lymphocytes are implied in the inflammatory process occurring in the development of atherosclerotic lesions specially by producing mediators such as growth factors and cytokines. These mediators are involved in all steps of plaque formation with for example, an increase in IL-6 expression at the early stage of atherosclerosis [Klouché et al., 2000]. The expression of adhesion molecules is modulated by such mediators: TNF- α promotes the expression of VCAM-1 and thus the leucocytes recruitment [Khan et al., 1995] and at the opposite, the IL-10 tends to prevent the evolution of atherosclerosis, at least at early stages, by decreasing the expression of VCAM and ICAM [Poteaux et al., 2006]. Moreover, IFN- γ , produced by activated T-lymphocytes, stimulates the macrophages [Shapiro et al., 1990] and decreases the collagen synthesis by smooth muscle cells leading to atherosclerotic plaque weakening [Amento et al., 1991]. Finally, Tissue Factor (TF) is implied in the thrombogenicity associated with plaque rupture [Tremoli et al., 1999].

The prevention of atherosclerosis complications like myocardial infarction, stroke or peripheral arterial diseases is one of the challenges of the last years. Amongst potential treatment, statins and specially atorvastatin are prescribed. Indeed, these molecules are reported to reduce the development of atherosclerosis [Makris et al., 2010], to contribute to plaque stabilization

[Libby and Aikawa, 2003] as well as to improve the endothelial function [De Jongh et al., 2002]. If they can act by mechanisms depending on their lipid lowering effects [Blum, 2014], their role on inflammatory process could also be involved [Antonopoulos et al., 2012]. Thus, we hypothesized that a long-term non-hypocholesterolemic treatment impacts the inflammatory process occurring during the early stages of atherosclerosis. If it was the case, atorvastatin could be used at long-term and low-dose avoiding its adverse effects such as a myotoxicity [Pasternak et al., 2002], hepatotoxicity [Russo et al., 2014] or increased risk of intracerebral hemorrhage [Westover et al., 2011]. To test our hypothesis, a study was implemented on Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits from the age of 3 to 12 months treated or not with 2.5mg/Kg body weight (bw)/day of atorvastatin. It was chosen as a model of hypercholesterolemia and spontaneous development of atherosclerosis (similarly to that developed in humans) [Shiomi and Ito, 2009]. P-selectin, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, IL-6, INF γ , Tissue Factor and IL10 blood concentrations were measured each month to assess the inflammatory process. Moreover, CRP blood concentrations were used as an early indicator of inflammation. The atherosclerosis evolution was followed using optical coherence tomography (OCT). Then, atherosclerotic plaques were ranked into several class according to their severity. Macrophage staining was also done to determine, for each class of plaque, the importance of colonization by these cells.

MATERIAL AND METHODS

1. Animals

This experimental project was conducted in compliance with “The guide for the care and use of laboratory animals” published by the National Institute of Health (NIH publication, Eight edition, 2010). It was approved by the local ethic committee for animal experimentation (Authorization number: CEEA.2012.189). This study was done on male homozygous WHHL rabbits (3165±489g) produced by CPA Jeanrot (FRANCE, 45160 Olivet).

During the experiment, animals were kept at the veterinary school of Nantes (Oniris, France) in an animal house under a 12-hours light-dark-cycle at 21°C. Food (Lapin Clapier PDC; Le Pré du Clocher; 44155 Ancenis). Water and food were given ad libitum.

2. Experimental design

Our study was performed on thirty four 3 month-old WHHL rabbits from the age of 3 to 12 months. They were randomized in two groups: control (C) and treated (T).

Treated group received 2.5mg/Kg body weight (bw)/day of atorvastatin (atorvastatin calcium PF-00079943-07 Pfizer) diluted in drinking water. Water with treatment was given in the first bottle of the day. When all this water was drunk, fresh water was given ad libitum. The control group had fresh water ad libitum. Animals were weighted every week to adjust the treatment. Every month, blood samplings were

performed on each animal. Every 3 months, control rabbits (at the age of 3, 6, 9 and 12 month) and treated animals (at the age of 6, 9 and 12 months) were anaesthetized and euthanized by intramuscular injection of ketamine (100mg/kg bw) and xylazine (10mg/kg bw) in order to perform OCT measurements. Vessels were also sampled at the same ages.

3. Blood sampling and analysis

Blood sampling were performed each month on vigil animals from the median artery of the ear with a catheter (Vasofix® certo 24G Braun réf 4269071) in a dry tube with gel (Vacuette® 456071) and in EDTA tube (Vacutainer® 368861). It was made under local anaesthesia with lidocaine (Lidocaïne Prilocaine Biogaran 5% ointment). Serum was removed after spontaneous coagulation and plasma after centrifugation at 3500 rpm/5mn. Then, serum and plasma were frozen in liquid nitrogen until analysis. After unfreezing at room temperature, several blood parameters were measured with specific kits either on serum or on plasma : LDL (LDL quantitation kit MAK045; Sigma-Aldrich), LDLox (CUSABIO® CSB-E06991Rb), CRP (Elabscience® E-EL-RB0005), IL10 (Elabscience® E-EL-RB0487), IL-6 (Elabscience® E-EL-RB0014), TNF α (Elabscience® E-EL-RB0011), INF γ (Elabscience® E-EL-RB0679), P-selectin (Elabscience® E-EL-RB2173), MCP-1 (CUSABIO® CSB-E06921Rb), Tissue Factor (Elabscience® E-EL-RB0375), ICAM-1 (Elabscience® E-EL-RB0889), VCAM-1 (Elabscience® E-EL-RB0391).

4. Optical coherence tomography image acquisition and analysis

When rabbits were anesthetized, a 4-french arterial catheter (Terumo®) was inserted into the right carotid and a conventional angioplasty guidewire (0.014 mm BMW, Abbott®) was introduced under radioscopic control into the carotid up to the iliac bifurcation, allowing positioning of the OCT image catheter. Rabbits were heparinized (0.5ml at 5,000 U/ml) and euthanized by intra-arterial injection of anesthetics (100 mg/kg bw ketamine; 10 mg/kg bw xylazine). 15 ml of contrast medium (meglumine and sodium ioxaglate 320 mg iodine/ml; Hexabrix 320 Guerbet) was flushed manually through the catheter at a rate of 1.5 ml/s. When a blood-free image was observed, the OCT imaging core (Terumo FastView op-16p2613) was withdrawn at a rate of 10 mm/s using stand-alone electronic control of the pull-back motor. Images were acquired from the iliac bifurcation to the aorta arch for each rabbit. The images acquired with OCT Lunawave (Terumo) were stored digitally for subsequent analysis.

Measurements were performed manually on the 890 observed plaques (29±6 plaques per rabbit) with the Terumo software on the OCT acquisition system. Then, each plaque was ranked in one of the 5 classes according to morphology and extension in the aortic section as follows:

Class 0: no atherosclerotic lesion; **Class 1:** small lesion (<20% lumen circumference), homogeneous or slightly distorted, with smooth surface and no lipid core; **Class 2:** small lesion

(<20% lumen circumference), heterogeneous, with lipid core; **Class 3:** moderate lesion (20-50% lumen circumference), heterogeneous, with irregular surface and lipid core; **Class 4:** large lesion (>50% lumen circumference), with arterial wall distortion, eroded appearance and ulceration.

5. Macrophages staining

Thanks to OCT images, parts of aorta with plaques of each class were sampled. They were washed in a saline solution (NaCl 137mM; KCl 5.4mM; CaCl₂ 2.5mM; Na₂HPO₄ 1.2mM; MgCl₂ 1.2mM; Hepes 20mM; D-Glucose 15mM). Then, samples were fixed in Bouin's solution (Bouin Gurr® 7000.1000, VWR) for 48h and included in paraffin (Paraplast®PLUS) and 5µm sections were cut. Then, sections were deparaffined and incubated 20 min with monoclonal mouse RAM11 antibodies (Dako M063301) diluted 1:50 to allow macrophage staining. Next, sections were washed in TBS and incubated for 15min with polyclonal anti-mouse antibodies (Dako E035401). Sections were washed in TBS and staining was obtained using streptavidin at 1:500 (Dako P039701) for 15 min and DAB (Dako K346711) for 15min. Negative controls were performed by omitting primary monoclonal antibodies during the first incubation. Sections were examined under a confocal microscope (Zeiss LSM 780) with a x20 lens and a camera (AxioCam Mrc; Zeiss). Images were exported in .tif format to be analyzed with ImageJ software.

6. Statistical analysis

Data were expressed as medians \pm IQR. Statistical tests were performed using SIGMA STATS 10 software (StatSoft). Given the small number of animals, blood results were pooled in three periods 4-6, 7-9 and 10-12 months. Non-parametric Kruskal-Wallis tests were used. Differences were considered as significant when $p < 0.05$.

RESULTS

1. Blood parameters

Throughout the experiment, no effect of atorvastatin treatment was observed on blood LDL and LDLox concentrations (Figure 1A and 1B). The same result was found for most blood parameters measured (Table 1).

Thus, CRP, IL10, TNF α , INF γ , MCP-1, TF, ICAM and P-Selectin blood concentrations were similar in both experimental groups throughout the experiment.

At the opposite, changes in IL-6 (Figure 2) and VCAM-1 (Figure 3) concentrations occurred. In control group, an increase in concentrations of these two parameters was observed during the 7-9 periods compared to the 4-6 and 10-12 periods. This increase was prevented by the atorvastatin treatment.

Group Age (months)	4-6	Control 7-9	10-12	4-6	Treated 7-9	10-12
CRP (ng/ml)	1.25 \pm 4.40 n=15	0.15 \pm 0.37 n=15	0.15 \pm 2.23 n=15	0.20 \pm 2.96 n=15	1.53 \pm 4.39 n=15	ND n=15
IL 10 (pg/ml)	0.00 \pm 7.17 n=15	0.52 \pm 16.21 n=15	0.00 \pm 0.83 n=15	0.00 \pm 8.08 n=13	ND n=14	0.00 \pm 8.08 n=15
TNF α (pg/ml)	4.38 \pm 98.04 n=14	12.38 \pm 47.7 9 n=15	3.52 \pm 85.38 n=15	0.00 \pm 55.62 n=14	19.64 \pm 74.6 8 n=15	12.35 \pm 50.5 8 n=15
INF γ (pg/ml)	12.73 \pm 51.6 n=14	0.00 \pm 1.55 n=15	ND n=15	0.00 \pm 3.75 n=14	0.00 \pm 0.62 n=15	0.00 \pm 4.27 n=15
MCP-1 (pg/ml)	15.60 \pm 9.56 n=15	9.34 \pm 9.92 n=15	10.76 \pm 8.23 n=13	15.99 \pm 29.7 2 n=11	8.79 \pm 9.95 n=15	7.45 \pm 6.25 n=15
TF (pg/ml)	182.5 \pm 181. 0 n=11	162.1 \pm 303. 5 n=12	159.0 \pm 193. 8 n=13	315.2 \pm 173. 1 n=10	142.7 \pm 161. 8 n=15	88.1 \pm 118.6 n=14
ICAM-1 (pg/ml)	0.00 \pm 0.06 n=15	ND n=15	ND n=15	0.00 \pm 0.04 n=11	0.00 \pm 0.01 n=14	ND n=15
P Selectin (pg/ml)	0.00 \pm 0.63 n=15	0.01 \pm 2.85 n=15	ND n=14	ND n=13	0.00 \pm 1.04 n=15	ND n=15

Table 1. CRP, IL10, TNF α , INF γ , MCP-1, TF, ICAM and P-selectin blood concentrations in control and treated groups for the three experimental periods: 4-6, 7-9 and 10-12 months. Medians \pm IQR, ND = not detectable.

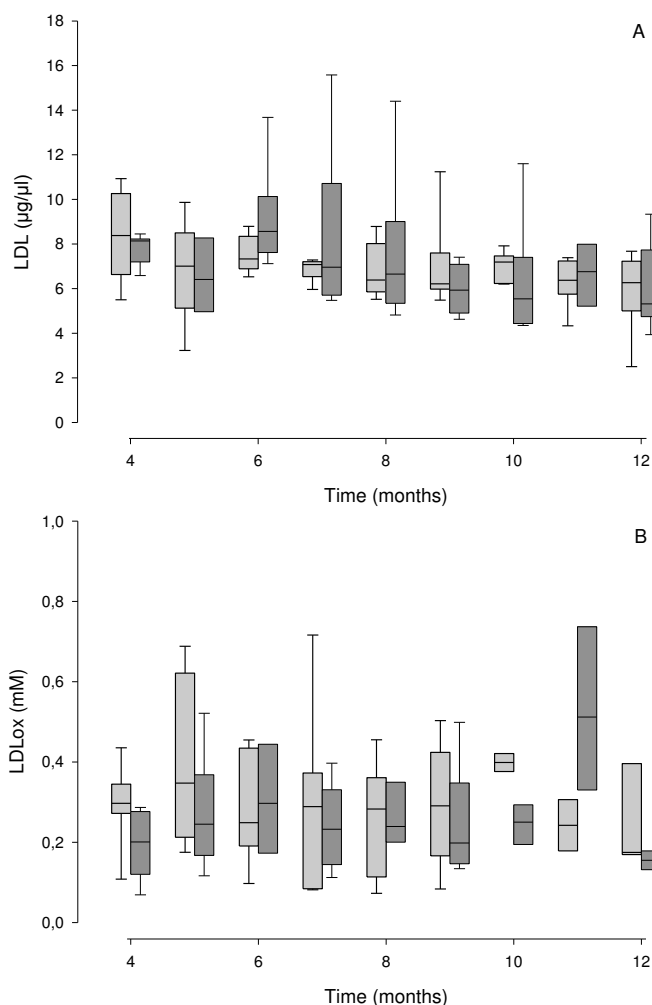


Figure 1. Blood LDL ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$, A) and LDLox (mM, B) concentrations in control (light grey) and treated (dark grey) groups. Medians \pm IQR.

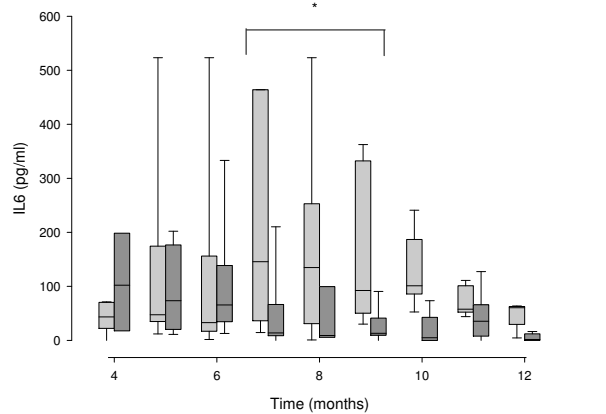


Figure 2. Blood IL6 (pg/ml) concentrations in control (□) and treated (■) groups. Medians ± IQR. * indicates a significant difference between control and treated groups over the 7-9 months period ($p < 0.05$).

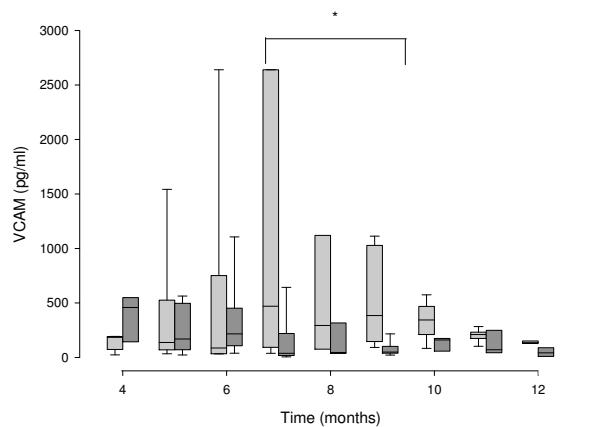


Figure 3. Blood VCAM-1 (pg/ml) concentrations in control (□) and treated (■) groups. Medians ± IQR. * indicates a significant difference between control and treated groups over the 7-9 months period ($p < 0.05$).

2. OCT analysis and macrophage staining

For each rabbit, the observed plaques were ranked in one of the class previously described and the mean class value was calculated. Then, the mean class value at 3, 6, 9 and 12 months for control and treated groups was calculated from the mean class value per rabbit previously determined. Results are presented in figure 4. At 6 months, mean class was significantly lower in

control group compared to treated group. This difference is not maintained at 9 and 12 months.

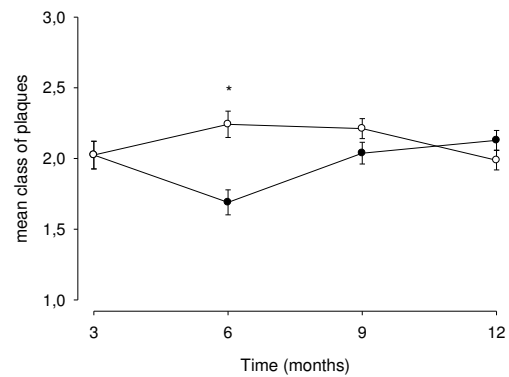


Figure 4. Mean class of plaque in control (○) and treated (●) groups. Mean ± SD. * indicates a significant difference ($p < 0.05$) in control group compared to treated group at 6 months.

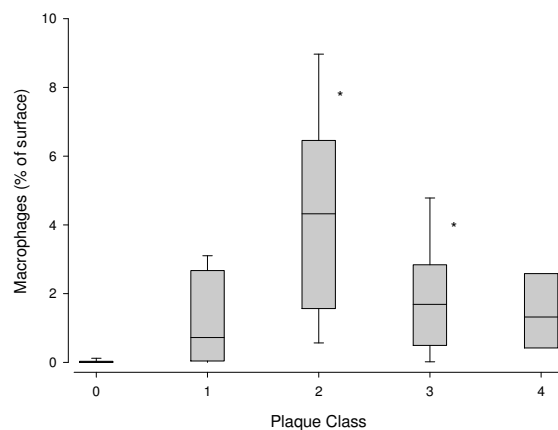


Figure 5. Percentage of surface occupied by macrophages for each class of plaque. Mediane ± IQR. * indicates a significant difference compared to class 0 ($p < 0.05$).

For each class of plaque, the percentage of surface occupied by macrophages was determined. As shown in figure 5, no significant staining was observed in class 0 (vessel without lesions). However, compared to class 0, a significant increase in % of surface occupied by macrophages was found in plaques of class 2 and class 3.

DISCUSSION

In this study, we hypothesized that a long-term treatment with atorvastatin even at a non-hyperlipidemic dose has an effect on atherosclerosis evolution focusing on inflammatory process. This work was done on Watanabe rabbit chosen as a model of hypercholesterolemia and spontaneous development of atherosclerosis (similarly to that developed in humans) [Shiomi & Ito, 2009]. In our study, the blood concentrations of LDL were followed monthly and no significant change in this parameter was found with the intake of atorvastatin. As it has been previously shown that atorvastatin acts mainly on the LDL blood concentration [Nawrocki et al., 1995], our results indicate that the atorvastatin concentration used is a low-dose. The initiation of atherosclerosis is often linked with the oxidative modification of LDL retained in the intima of the vessels [Witztum, 1994]. However, in our study, no change in LDLox blood concentrations was observed without or with atorvastatin intake. It could be hypothesized that, in our model, the oxidation of LDL occurred mainly in the atherosclerotic lesions ie in the artery wall leading to a lack of changes in LDLox at blood level [Witztum & Steinberg, 1991]. Further investigations are necessary to test this hypothesis and the LDLox level in atherosclerotic lesions should be determined.

Numerous studies have shown that several adhesion molecules such as MCP-1, P-Selectin, ICAM-1 or VCAM-1 are implied in white blood cell recruitment and development of atherosclerotic lesions [Johnson-Tidey et al.,

1994; Gu et al., 1998; Nakashima et al., 1998; Gosling et al., 1999]. However, their implication seems to be dependant from the model used. For example, Cybulsky et al. [2001] have shown that VCAM-1 but not ICAM-1 plays a major role in early atherosclerosis whereas Collins et al. [2000] have shown that P-Selectin or ICAM-1 deficiency protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. In our study, no change in MCP-1, P-Selectin and ICAM-1 was observed in control group whereas a significant increase in VCAM-1 was found in the period 6-9 months. It could be hypothesized that this increase is linked to an increase in severity of atherosclerotic lesions. Indeed, mean class of plaque tends to increase in the control group (the mean class of plaque is higher than 2 at 6 months) and the atherosclerotic lesions of class 2 exhibited the highest % of surface occupied by macrophages. In our model, VCAM-1 appears to play an important role in the development of atherosclerosis. However, its involvement either in initiation and/or in establishment of atherosclerotic lesions should be clarified. Interestingly, in our study, the increase in VCAM-1 in the control group does not occur when rabbits were treated with atorvastatin. Moreover, in this group, the mean class of plaque (ie severity of atherosclerosis) is significantly lower at 6 months than what was observed for the control group. Our results indicate that atorvastatin can delay the evolution of atherosclerosis in our model in part by acting on the leucocytes recruitment and emigration in the artery wall. It is important to point out that the effects of statins on adhesion molecules could be dependant on model and/or dose used. For

example, in a previous study on human, no change in blood concentration of VCAM-1 was found after one year of treatment with a hypolipidemic dose of atorvastatin [Seljeflot et al., 2002].

In our study, no change in CRP, IL10, TNF α , INF γ , TF blood concentrations was observed throughout the experiment in control group and atorvastatin has no effect on these parameters. These results could appear surprising as these molecules have been shown to be pro-atherogenic (TNF α , INF γ) or anti-atherogenic (IL10) in several studies [see review by Buckley & Ramji, 2015]. However, as we have focussed only on circulating levels, it is possible that changes have occurred on cellular levels. Changes in expression of these molecule receptors in arteries should be investigated. A significant increase in IL-6 has been shown in our study in control group at the 6-9 month period. As for VCAM-1, this increase is prevented by the atorvastatin treatment. This pro-inflammatory cytokine is produced by smooth muscle cells (SMC); it has been found in the early stages of atherosclerosis and could participate to proliferation of SMC leading to development of atherosclerosis [Klouche et al., 2000]. From our results, it could be hypothesised that atorvastatin by decreasing IL-6 circulating level could limit the proliferation of SMC and thus the evolution of atherosclerosis. Further investigations are required to test this hypothesis.

In conclusion, we have shown in the WWHL rabbit model that a long-term treatment with atorvastatin at a low-dose can delay the evolution of atherosclerosis. These effects are at least in

part mediated by VCAM-1 and Il-6. Atorvastatin could act both on early stage (effect on leucocyte adhesion) and late stage (proliferation of SMC) of this disease.

REFERENCES

- Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis and thrombosis.* 1991;11:1223-1230
- Antonopoulos AS, Margaritis M, Lee R, Channon K, Antoniades C. Statins as anti-inflammatory agents in atherogenesis: molecular mechanisms and lessons from the recent clinical trials. *Current pharmaceutical design.* 2012;18:1519-1530
- Bhakdi S, Dorweiler B, Kirchmann R, Torzewski J, Weise E, Trantum-Jensen J, Walev I, Wieland E. On the pathogenesis of atherosclerosis : enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J Exp Med.* 1995;182:1959-1971
- Blum A. HMG-CoA reductase inhibitors (statins), inflammation, and endothelial progenitor cells. New mechanistic insights of atherosclerosis. *BioFactors.* 2014;40(3):295-302
- Buckley ML and Ramji DP. The influence of dysfunctional signaling and lipid homeostasis in mediating the inflammatory responses during atherosclerosis. *Biochimica et biophysica acta.* 2015;1852:1498-1510

- Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-selectin or Intracellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191(1):189-194
- Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107:1255-1262.
- Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rolling BJ, Charo IF. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest.* 1999;103:773-778
- Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Molecular Cell.* 1998;2:275-281
- Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *American journal of pathology.* 1994;144(5):952-961
- de Jongh S, Lilien MR, Op't Roodt J, Stroes ESG, Bakker HD, Kastelein JJP. Early statin therapy restores endothelial function in children with familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:2117-2121
- Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM. Modified low density lipoprotein and its constituent augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1995;95:1262-1270.
- Klouche M, Rose-John S, Schmiedt W, Bhakdi S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation and proliferation. *Circulation.* 2000;101:1799-1805
- Libby P and Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins. *Am J Cardiol.* 2003;91:4B-8B
- Makris GC, Lavidia A, Nicolaides AN, Geroulakos G. The effect of statins on carotid plaque morphology: a LDL-associated action or one more pleiotropic effect of statin? *Atherosclerosis.* 2010;213:8-20
- Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-Deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:842-851
- Nawrocki JW, Weiss SR, Davidson MH, Sprecher DL, Schwartz SL, Lupien PJ, Jones PH, Haber HE, Black DM. Reduction of LDL cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(5):678-682
- Pasternak RC, Smith SC, Bairez-Merz CN, Grundy SM, Cleeman JI, Lenfant C. ACC/AHA/NHLBI Clinical advisory on the

- use and safety of statins. *JACC*. 2002;40(3):567-572
- Potteaux S, Deleuze V, Merval R, Bureau MF, Esposito B, Scherman D, Tedgui A, Mallat Z. In vivo electrotransfert of interleukin10 cDNA prevents endothelial upregulation of activated NF- κ B and adhesion molecules following an atherogenic diet. *Eur Cytokine Netw*. 2006;17(1):13-18
- Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*. 1999;340(2):115-126
- Russo MW, Hoofnagle JH, Gu J, Fontana RJ, Barnhart H, Kleiner DE, Chalasani N, Bonkovsky HL. Spectrum of statin hepatotoxicity: experience of the drug-induced liver injury network. *Hepatology*. 2014;60(2):679-686
- Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnesen H. Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2002;162:179-185
- Shapiro SD, Campbell EJ, Kobayashi DK, Welgus HG. Immune modulation of metalloproteinase production in human macrophages. Selective pretranslational suppression of interstitial collagenase and stromelysin biosynthesis by interferon- γ . *J clin Invest*. 1990;86:1204-1210
- Shiomi M and Ito T. The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: A tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis*. 2009;207:1-7
- Tremoli E, Camera M, Toschi V, Colli S. *Atherosclerosis*. 1999;144:273-283
- Westover MB, Bianchi MT, Eckman MH, Greenberg SM. Should statins be avoided after intracerebral hemorrhage? *Arch Neurol*. 2011;68(5):573-579
- Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *The lancet*. 1994; 344(8925):793-795
- Witztum JL and Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 1991;88:1785-1792

2. DISCUSSION

Le but de cette étude était de déterminer les paramètres de l'inflammation qui pouvaient être modifiés par un traitement à l'atorvastatine à faible dose, donné sur le long terme à des lapins Watanabe. En effet, l'athérosclérose est une pathologie chronique dont l'initiation le développement et l'instabilité dépendent, entre autre, de phénomènes inflammatoires [Ross, 1999].

L'initiation de cette pathologie repose en grande partie sur la présence, l'adhésion, l'internalisation et l'oxydation de LDL [Witztum, 1994]. Au niveau circulant, nous avons une présence importante de LDL chez le modèle [Tanzawa *et al.*, 1980]. L'effet hypocholestérolémiant de l'atorvastatine agit principalement sur le LDL [Nawrocki *et al.*, 1995]. Dans notre étude, les taux circulants de LDL ne sont pas modifiés, ce qui confirme que la dose utilisée est faible. Bien que l'oxydation des LDL soit indispensable au processus athéromateux [Steinberg, 1997] nous n'avons pas observé de modification de ce paramètre au niveau circulant au cours du temps ou avec le traitement. Ceci pourrait être expliqué par le fait que ce phénomène se déroule principalement en intra-tissulaire (dans la paroi vasculaire) et non dans le compartiment sanguin, limitant la présence de LDLox en circulant [Witztum & Steinberg, 1991]. En complément de cette mesure, il serait alors particulièrement pertinent de mesurer l'évolution de la quantité de LDLox intraplaques.

Au niveau des facteurs d'adhésion, nous observons une diminution significative de la quantité de VCAM-1 dans le compartiment circulant des animaux traités par rapport aux animaux contrôles sur la période 7-9 mois. Le traitement permet donc de limiter l'adhésion des monocytes circulants dans cette tranche d'âge, ce qui pourrait conduire à une limitation du nombre de macrophages dans l'espace sous-

endothélial. La réduction de l'extravasation monocytaire pourrait alors ralentir le développement de la pathologie ou en réduire la sévérité. Pour déterminer cela, l'aorte des lapins a été analysée en OCT et nous avons pu déterminer 4 classes de plaques de sévérités différentes. Après avoir classé chacune des plaques présentes entre la crosse aortique et la bifurcation iliaque de nos individus, la moyenne des classes présente à un âge et une condition expérimentale donnée a été réalisée. Il apparaît que la classe moyenne (et donc la sévérité moyenne des plaques chez un individu) est significativement réduite avec le traitement à l'âge de 6 mois. Ce résultat est tout à fait cohérent avec la réduction de la quantité de VCAM-1 circulant observée précédemment. Le traitement a donc un effet protecteur vis-à-vis de l'évolution de la sévérité de la pathologie qui passe par une diminution transitoire de la molécule d'adhésion VCAM-1. De façon intéressante, on peut remarquer que cette réduction de VCAM-1 avec un traitement atorvastatine à faible dose diffère des résultats obtenus dans une autre étude menée chez l'homme [Seljeflot *et al.*, 2002]. Dans cette étude, un traitement d'un an à dose hypolipémiante d'atorvastatine ne modifierait pas la quantité de VCAM-1 circulant et l'utilisation d'une autre statine, la simvastatin aurait même pour effet une augmentation de ce paramètre. En revanche ces deux substances réduiraient ICAM-1 et P-selectine. Il semblerait donc que la modification de l'expression des paramètres de l'adhésion dépende de la dose utilisée et/ou du modèle d'étude.

Lorsque l'on s'intéresse à la proportion de macrophages présents au sein d'une plaque, on remarque une augmentation de la proportion de macrophages au niveau des plaques de classes 2 et 3 par rapport à la classe 0 (sans plaque). Ceci est en adéquation avec l'apparition progressive des macrophages durant le développement de la plaque et une disparition de ceux-ci avec la dégradation des

cellules spumeuses dans les lésions les plus avancées. Aucune différence n'a été observée entre les animaux contrôles et traités sur la proportion de macrophages au sein de chaque classe. Le classement est donc robuste, avec une proportion de macrophages propre à chaque classe. Le traitement ne modifie donc pas les caractéristiques de la classe mais la distribution des plaques dans les différentes classes. En définitive, le traitement limite l'internalisation des macrophages ce qui participe à une moindre sévérité des plaques. Par ailleurs, le dosage des principales cytokines circulantes impliquées dans le développement de l'athérosclérose a révélé une diminution significative de la présence de l'interleukine 6 (IL6) avec le traitement sur la période 7-9 mois. Le traitement agirait donc aussi sur la voie de l'IL6 pour réduire la sévérité des plaques.

En conclusion, le traitement a conduit, en l'absence de modification sur le LDL et le LDLox, à une réduction de l'expression de certains paramètres de l'adhésion et de l'inflammation (VCAM-1, IL6) participant au développement de la pathologie athéromateuse. Cette diminution a notamment contribué à la réduction de la sévérité moyenne des plaques présentes chez nos lapins. Ces paramètres, modifiables par les statines, sont cependant classiquement décrits comme évoluant en synergie avec d'autres facteurs de l'adhésion et de l'inflammation [Jain & Ridker, 2005 ; Ascer *et al.*, 2004]. Par exemple les variations de l'IL6 sont souvent corrélées avec une variation conjointe de la CRP puisque la présence d'IL6 augmente la production par le foie de la CRP [Harris *et al.*, 1999]. Ici la CRP circulante n'est pas modifiée par le traitement bien qu'elle constitue classiquement un marqueur de risque coronarien aigu [Liuzzo *et al.*, 1994 ; Biasucci *et al.*, 1999] modifié par les statines [Ridker *et al.*, 1998 ; Ridker *et al.*, 2001]. Il apparaît alors que l'IL6, marqueur de risque cardiovasculaire [Woods *et al.*, 2000 ; Biasucci *et al.*, 1996] pourrait être un marqueur

plus précoce ou plus sensible que la CRP pour le risque d'accident cardiovasculaire aigu. Les modifications de l'IL6 étant souvent accompagnées de changements au niveau des facteurs de la coagulation (fibrinogène, plaquettes) [Woods *et al.*, 2000], l'investigation de ces paramètres pourrait être une des pistes de réflexions à poursuivre.

Dans cette étude, les paramètres mesurés ont été quantifiés au niveau circulant. Cependant les molécules de l'adhésion sont particulièrement importantes lorsqu'elles sont exprimées à la surface de l'endothélium pour le recrutement des leucocytes. De même les interleukines peuvent être exprimées par les cellules de la réponse inflammatoire et immunitaire à l'intérieur de la plaque. Afin de poursuivre cette étude, la quantification des paramètres étudiés dans ce chapitre de thèse devraient se poursuivre par leur quantification au niveau tissulaire.

De même, cette étude s'intéresse à des paramètres de l'initiation et du développement des plaques mais pas aux éléments spécifiques de leur déstabilisation pouvant conduire à la rupture. Il serait notamment intéressant de poursuivre en ce sens avec l'étude des MMPs circulantes et tissulaires.

Enfin, dans ces trois premiers chapitres nous nous sommes intéressés aux éléments fonctionnels, structurels et mécanistiques potentiellement modifiables par la prise d'un traitement par statine au niveau des artères. Cependant, le système cardiovasculaire ne se limite pas aux artères et ils pourraient être pertinents de s'intéresser aux potentielles modifications sur le système veineux et sur le cœur. En effet, la fonction du système cardiovasculaire ne peut être assurée que par l'intégrité de l'ensemble de ses éléments constitutifs.

Le prochain chapitre (**chapitre 4**) aborde donc les effets potentiels de notre traitement sur le tissu cardiaque et plus particulièrement sur ses capacités oxydatives et sa susceptibilité vis-à-vis des espèces réactives de l'oxygène.

CHAPITRE 4 :
**Capacités oxydatives et susceptibilité
aux ROS du myocarde**

1. INTRODUCTION

Le muscle cardiaque est un élément fondamental du système cardiovasculaire. Avec l'âge ou les facteurs de risques cardiovasculaires, ce muscle peut voir son métabolisme modifié, notamment au niveau mitochondrial.

La mitochondrie produit 90% de l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire *via* la production d'ATP [Rolfe *et* Brown, 2009]. La synthèse d'ATP se fait par phosphorylation oxydative (Figure 28) *via* la F_0F_1 -ATPase. Cette enzyme utilise le gradient de protons présent entre l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale. Ce gradient est maintenu grâce au transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale (une série de réactions d'oxydo-réductions avec l' O_2 comme accepteur final d'électron). La chaîne respiratoire est composée de quatre complexes protéiques codés par les génomes nucléaires et mitochondriaux:

- La NADH coenzyme Q oxydoréductase ou complexe I
- La Succinate déshydrogénase ou complexe II
- La Coenzyme Q cytochrome C oxydoréductase ou complexe III
- La Cytochrome oxydase ou complexe IV

Les électrons sont transportés entre ces différents complexes par l'ubiquinone (coenzyme Q) et le cytochrome C.

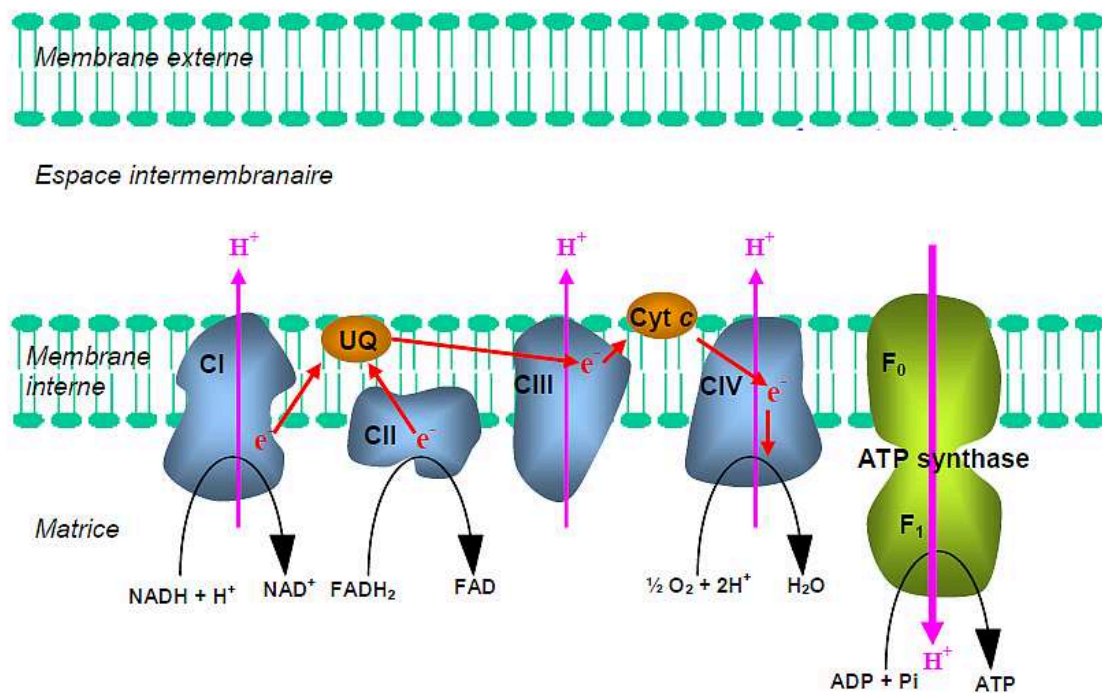


Figure 28 : Représentation du système de phosphorylation oxydative de la mitochondrie. CI à CIV : les quatre complexes de la chaîne respiratoire, UQ : ubiquinone et Cyt c : cytochrome c : les transporteurs mobiles d'électrons, ATP synthase : F₀F₁-ATPase. Le trajet des électrons (e⁻) est représenté par les flèches rouges et celui des protons (H⁺) par des flèches roses (Flamment, 2009).

Une fuite d'électrons au sein de la chaîne respiratoire est à l'origine de la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) notamment *via* la réduction de l'O₂. Il est estimé que 0.1 à 4% de l'O₂ présent au niveau de la mitochondrie conduirait à la production d'espèces radicalaires [Murphy, 2009]. Les ROS produites au niveau cellulaire le sont à 90% par la phosphorylation oxydative mitochondriale [Balaban *et al.*, 2005], même si d'autres organites (lysosomes, réticulum endoplasmique lisse, peroxysomes, noyau) ou des sources cytoplasmiques (NADPH-oxydase -NOX, xanthine oxydase, cyclooxygénases, enzymes de la voie de l'acide arachidonique) sont également source de ROS [Delattre *et al.*, 2005].

Il existe différents types de ROS :

- L'anion superoxyde O_2° , produit principalement par la chaîne respiratoire
- Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , produit notamment par la NOX ou la SOD
- L'oxyde nitrique NO
- Les hydroperoxydes ROOH
- L'acide hypochloreux HOCl
- Le Peroxynitrite $ONOO^{\circ}$
- Le radical hydroxyle HO°
- Le radical alkoxyde RO°
- Le radical peroxyde RO_2°

Les ROS sont essentiels à l'homéostasie cellulaire. Ils entrent en particulier dans de nombreuses voies de signalisation [D'Autréaux *et* Toledano, 2007 ; Mittler *et al.*, 2011], dont celle de l'apoptose [Simon *et al.*, 2000]. A des concentrations plus importantes que les conditions physiologiques, ils peuvent provoquer des dommages oxydatifs comme des attaques oxydantes de la chaîne respiratoire, de l'ADN, des protéines ou encore des lipides (AG insaturés membranaires). Pour se protéger vis-à-vis de ces attaques, la cellule possède des systèmes anti-oxydants (enzymatiques ou non enzymatiques) qui métabolisent ou piègent les ROS. La SOD (superoxyde dismutase) cytosolique ou mitochondriale, la CAT (Catalase), la GPx (Glutathion peroxydase) et la GR (Glutathion réductase) font partie des systèmes anti-oxydants enzymatiques tandis que les vitamines A et E, certains Oligo-éléments, le glutathion réduit, l'ubiquinone ou encore le Cytochrome C font partie des systèmes anti-oxydants non enzymatiques.

Le stress oxydant fait partie intégrante du développement de l'athérosclérose. En effet, un déséquilibre entre production et destruction des ROS va avoir un effet athérogène direct, ou indirect (modification de protéines de cascades de signalisation) à différents niveaux vasculaires. Par exemple, le stress oxydant favorise l'oxydation des lipoprotéines de basse densités (LDLox) et de nombreux radicaux libres et pro-oxydants vont conduire à l'oxydation des LDL. D'autres lipoprotéines peuvent également subir des modifications oxydatives comme la lipoprotéine (a) ou les lipoprotéines de haute densité (HDL). Ces dernières ont cependant un rôle bien moins important dans le développement de l'athérosclérose que les LDL. De même, une dysfonction endothéliale peut être induite par la surproduction au niveau de l'endothélium de l'anion superoxyde. Celui-ci va pouvoir être produit par la eNOS, qui est connue pour son rôle dans la synthèse du NO mais, qui en cas de déficience en substrat (L-arginine) ou de co-facteur (BH₄), va être découplée et va produire de l'anion superoxyde. La NADPH oxydase est aussi une source de stress oxydant au niveau de l'endothélium (Figure 29). L'augmentation de l'activité de cette enzyme peut en effet induire une dysfonction endothéliale, une hypertrophie vasculaire et un risque élevé d'athérosclérose [Guzik *et al.*, 2000]. Les anions superoxyde produits vont réagir avec l'oxyde nitrique pour former du peroxynitrite, réduisant ainsi la biodisponibilité du NO, participant ainsi à la dysfonction endothéliale et à une réduction de la vaso-relaxation [Gryglewski *et al.*, 1986 ; White *et al.*, 1994].

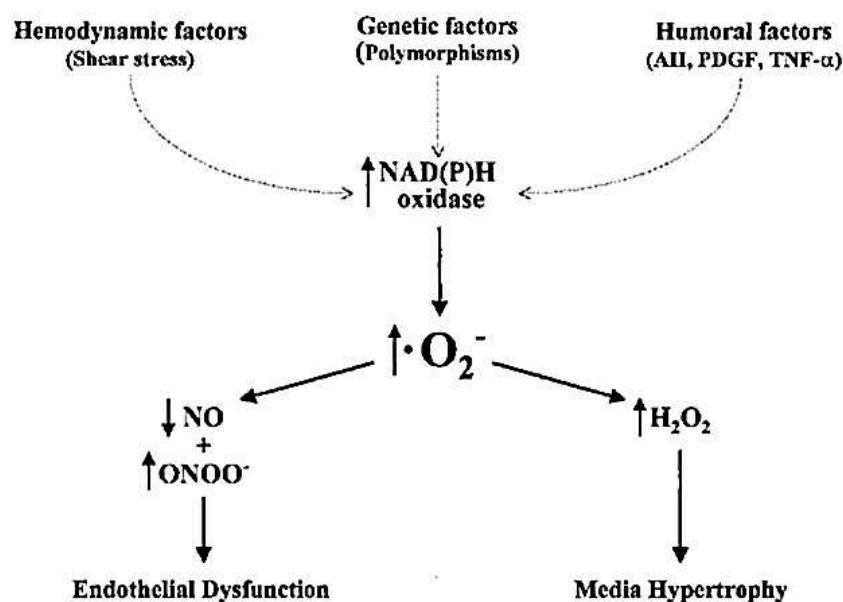


Figure 29 : Activation des NADPH oxydases vasculaires et leur conséquences (Zalba *et al.*, 2001).

Chez le lapin Watanabe, notre modèle étude, on peut observer une augmentation de la production d'anion superoxyde par la NADPH oxydase au cours du développement de l'athérosclérose [Warnholtz *et al.*, 1999]. En outre, l'angiotensine II, agent vasoconstricteur, est un élément très important dans l'activation de la NADPH oxydase, notamment dans les premiers stades de développement de l'athérosclérose [Warnholtz *et al.*, 1999]. L'angiotensine II et la NADPH sont également impliquées dans l'expression de molécules d'adhésion comme VCAM-1 ou ICAM-1 [Tummala *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2003], et de facteurs de transcriptions impliqués dans l'inflammation comme NF-κB [Tummala *et al.*, 1999]. Ils participent par ce biais à l'internalisation du LDL et à l'augmentation locale de l'inflammation au niveau des plaques d'athérome. La présence de LDLox et la production d'anion superoxyde par la NADPH oxydase des cellules musculaire lisses engendrent un stress oxydant qui va conduire à la prolifération et à la migration des

cellules musculaires lisses, favorisant ainsi le passage de la strie lipidique à la plaque d'athérome. L'angiotensine II et les ROS peuvent également contribuer à la fragilisation des lésions athéromateuses. En particulier, ils sont impliqués dans la régulation de l'apoptose par la voie des MAP Kinases et de ERK1/2 [Rossig *et al.*, 2002] qui peut participer à l'instabilité du noyau lipidique. De même, la présence de LDLox et de ROS favorisent l'expression de Metalloprotéases matricielles [Xu *et al.*, 1999 ; Luchtefeld *et al.*, 2005] qui vont fragiliser la plaque et participer à sa rupture.

La prise de statine peut avoir des effets anti-oxydants : au niveau vasculaire elle peut prévenir la dysfonction endothéliale liée à la réduction de la biodisponibilité du NO. En effet, l'hyperlipidémie réduit la biodisponibilité du NO. Grâce à leurs effets hypolipidémiants, les statines préservent l'action vasodilatatrice du NO [Maron *et al.*, 2000]. Pour autant, les statines ont des effets anti-oxydants indépendants d'une modification de la cholestérolémie (Figure 30). En effet, elles peuvent interagir avec la voie du NO en inhibant la synthèse du mévalonate, elles empêchent aussi l'isoprénnylation de la GTPase Rho qui réduit l'expression endothéliale de la eNOS [Laufs *et Liao*, 1998]. L'activité de la eNOS peut aussi être augmentée par les statines au travers de l'activation de la voie PI3K/AKT ou en interagissant avec l'HSP 90 (Heat-shock protein 90) [Laufs, 2003]. En favorisant la voie du NO, les statines permettent donc un maintien de la fonction endothéliale, stabilisent la plaque d'athérome et limitent l'agrégation plaquettaire. Par ailleurs, les statines peuvent réduire la production de ROS en empêchant l'activation de la NADPH oxydase et donc la synthèse d'anion superoxyde [Delbosc *et al.*, 2002(a) ; Delbosc *et al.*, 2002(b)].

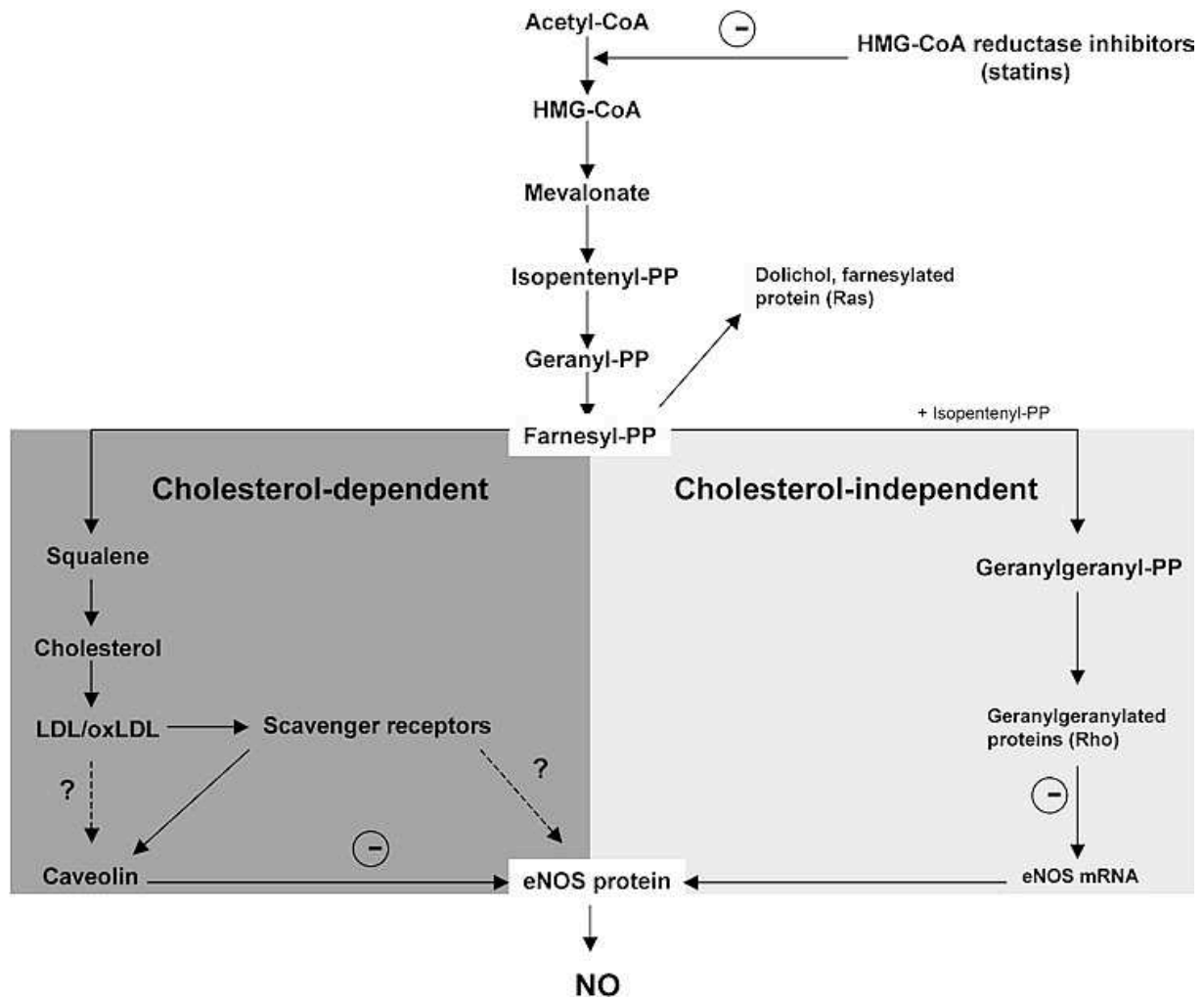


Figure 30 : inhibition de la eNOS par la voie du mévalonate, action inhibitrice des statines sur les voies cholestérol-dépendantes et indépendantes (Laufs, 2003)

Le myocarde a des demandes métaboliques élevées, il est donc riche en mitochondries. Et comme présenté précédemment, les mitochondries sont le siège de la production d'une grande partie des ROS générés par la fuite d'électrons au cours du vieillissement et/ou du développement de l'athérosclérose. Le myocarde est donc particulièrement exposé au stress oxydant (Figure 31).

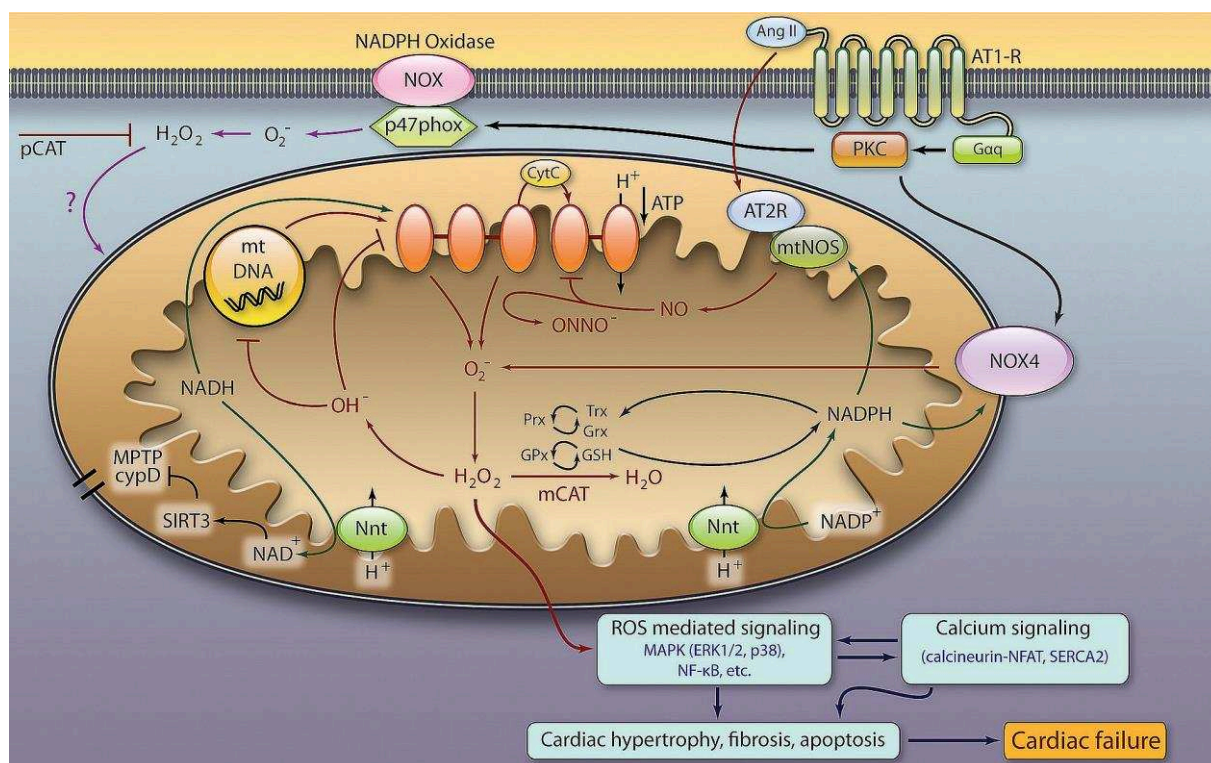


Figure 31 : Voies d'amplification des ROS au niveau mitochondrial cardiaque dans le cadre du vieillissement et des pathologies cardiovasculaires (Dai et al., 2012).

Il n'existe que très peu de données sur les effets des ROS au niveau du myocarde dans le cadre du développement de l'athérosclérose ou d'un traitement pris dans le cadre de cette pathologie. A notre connaissance, la principale étude à ce niveau concerne les travaux réalisés en 2010 par Jamal Bouitbir. Ses résultats *in vitro* montrent une légère augmentation de l'attaque radicalaire au niveau du muscle cardiaque en présence de statines mais une forte augmentation de l'attaque radicalaire dans le cas du muscle squelettique. Ces augmentations auraient *in vivo* des effets très différents d'un territoire à l'autre puisque délétères au niveau des muscles squelettiques (en accord avec les effets indésirables observés au niveau musculaire suite à la prise de statine type rhabdomyolyse) et protecteurs au niveau cardiaque (cette production de ROS permettant a priori de développer les systèmes antioxydants et favorisant la biogénèse mitochondriale). Ces effets ont cependant été

observés dans le cas d'une prise médicamenteuse à dose hypocholestérolémiante. Dans le cadre de notre étude, nous travaillons avec des doses faibles (non hypocholestérolémiantes) de statines et il apparaît pertinent de regarder si à ces concentrations, des effets sont observables au niveau des capacités oxydatives du myocarde.

Il est également à noter que les capacités oxydatives cellulaires sont modifiées avec l'âge. En effet, selon la théorie du vieillissement, proposée pour la première fois par Harman [Harman, 1956], il existe un lien étroit entre la détérioration mitochondriale dépendante de l'âge et l'attaque des ROS. Ainsi, avec le temps, les mitochondries produisent de plus en plus de ROS au niveau vasculaire [Ungvari *et al.*, 2007] cardiaque [Judge *et al.*, 2005]. Au cours du temps les mitochondries vont donc produire plus de ROS, qui ne seront pas pris en charge par les systèmes antioxydants et vont générer un stress oxydatif à l'origine d'une réduction des capacités oxydatives de la cellule et d'une réduction de la synthèse d'ATP. Les complexes I et IV sont particulièrement touchés [Navarro *et Boveris*, 2007], limitant le transport d'électrons ce qui va réduire la production d'ATP, augmenter la fuite d'électrons et donc augmenter à son tour la production de ROS. En plus de la dysfonction de la chaîne de transport d'électrons, il apparaît avec l'âge une dérégulation des défenses antioxydantes [Van der Loo *et al.*, 2000]. Cette théorie du vieillissement est particulièrement importante au niveau vasculaire [Ungvari *et al.*, 2010].

Dans le cadre de ce travail, nous ne pourrions pas dissocier les effets du vieillissement de ceux liés au développement de l'athérosclérose. Cependant, nous apporterons des éléments de compréhension concernant l'interaction entre le vieillissement pathologique (développement de l'athérosclérose) et la prise

d'atorvastatine à faible dose sur les capacités oxydatives et la susceptibilité aux ROS du myocarde. Pour cela, les consommations d'oxygène de fibres cardiaques perméabilisées ont été mesurées avant et après ajout d'ADP dans le milieu en présence de pyruvate/malate en excès. Les mêmes mesures ont été réalisées suite à une exposition aux ROS (réaction de Fenton) pour déterminer la susceptibilité aux ROS. Enfin des dosages d'activité des enzymes anti-oxydantes GPx et SOD ont été réalisés ainsi que la quantification du MDA. Le protocole détaillé ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans **l'article 4**

Article 4

Long-term atorvastatin treatment decreases mitochondrial vulnerability to reactive oxygen species in a model of hereditary hypercholesterolemia (Watanabe rabbits)

F. TISSIER¹, F. FARHAT¹, C. PHILOUZE¹, J-C. DESFONTIS², R. DIDIER^{1,3}, M. GILARD^{1,3}, Y. MALLEM², J. MANSOURATI^{1,3}, C. MOISAN¹, K. PICHAVANT¹, M. THERON¹ & A. AMÉRAND¹

Affiliations

¹EA 4324 ORPHY, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, Brest, France

²LUNAM Université, UPSP 5304 de physiopathologie animale et pharmacologie fonctionnelle, Oniris, Nantes, France

³Département de cardiologie, CHRU, Brest, France

ABSTRACT

In the context of cardio-vascular diseases treatment, few studies are available on the long-term and low-dose effects of statins on the mitochondrial function and ROS (Reactive Oxygen Species) metabolism at cardiac level. This study, hence, aimed to determine potential effects of an atorvastatin long-term treatment on the myocardium mitochondrial respiration. 34 Watanabe rabbits were treated or not with atorvastatin (2.5 mg/Kg/Day) from the age of 3 to 12 months. Every three months, were measured (1) the basal (V₀) and maximal (V_{max}) mitochondrial respiration on cardiac

permeabilized fibers and the proton leak (2) their vulnerability to ROS, (3) the cardiac enzymatic antioxidant defenses and (4) the oxidative damage (lipoperoxidation). In Watanabe rabbits the proton leak increased over the duration of the experiment. The statin treatment induced a decrease of V_{max} and a decrease of ROS susceptibility of cardiac mitochondria. The lipoperoxidation and the antioxidant defenses were modified neither in time nor by treatment. To our knowledge, this is the first study to identify a protective effect of statins against the susceptibility to ROS of the cardiac muscle in the context of a long-term treatment.

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in Europe and North America. Atherosclerosis is particularly involved in acute cardiovascular events such as myocardial infarction or stroke [Lutgens and Daemen, 2004]. To reduce the risk of recidivism, statin therapy can be implemented with the commonly used

atorvastatin [Jackevicius et al., 2012]: this HMGCoA reductase inhibitor (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitor) reduces plasma cholesterol, limits the progression of atherosclerosis and of cardiovascular risks [Amarengo et al., 2004]. But the statins are known to modify mitochondrial activity. In fact, depending on the organs or territories involved, the statin may interact differently with the mitochondria and their unavoidable by-products, ROS (Reactive Oxygen Species) [Dröge, 2002; Wassmann and Nickenig, 2003]. The statin could, indeed, induce alterations of skeletal muscles [Tomaszewski et al., 2011] through a deleterious increase in ROS production whereas it has beneficial effects in the myocardium via an increase in mitochondrial density and moderate increase in ROS generation (mitohormesis mechanism [Bouitbir et al., 2012]). Aging also is known to reduce mitochondria numbers and to increase ROS production [Barja, 2004]. Hence, it might be interesting to investigate the effect of a statin treatment on a long-term basis on mitochondria functioning. A rapid overview of the literature shows that the effects of aging or statin treatment on the mitochondria function and ROS metabolism (production, antioxidant enzymes, attack) have already been studied but not together. What is more, one of the originalities of this study is to

focus on the vulnerability of the mitochondria respiratory function to the harmful effect of ROS.

Moreover, the use of statin may lead to adverse effects depending on the doses used [Holbrook et al., 2011]. In order to try and limit these adverse effects it might be useful to reduce the doses administered. This study therefore strives to determine the effects of a long-term low-concentration atorvastatin treatment at the cardiac level. Watanabe rabbits were used as a model which presents a familial hypercholesterolemia and spontaneously develops atherosclerotic plaques similar to those found in humans [Shiomi and Ito, 2009]. The low-dose (2.5 mg / Kg / Day) is given from the age of three months to the age of 12 months. Every three months, the treatment effect on myocardium was studied by measuring (1) the basal and maximal mitochondrial respiration on cardiac permeabilized fibers and the proton leak(2) the vulnerability to ROS (with or without previous in vitro ROS exposure), (3) the enzymatic antioxidant defenses and (4) the oxidative damage (lipoperoxidation).

MATERIAL AND METHODS

1. Ethical Approval

The experimental design was approved by the Committee on Animal Care and Use of

Pays de la Loire with authorization number CEEA.2012.189. It is in accordance with the European Council's revised guidelines on animal care for experimental and other scientific purposes.

All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

2. Animals

The experiment was performed on 34 male homozygous WHHL-rabbits ($3,165 \pm 489$ g) produced by CPA Jeanrot (45160 Olivet, France).

Animals were kept at Oniris (France) in animal housing under a 12-hour light-dark cycle at 21°C. Food (Lapin Clapier PDC, Le Pré du Clocher, 44155 Ancenis, France) and water were given ad libitum.

3. Experimental conditions

The rabbits were randomized in two groups: control (C) and treatment (T). The treatment group received 2.5 mg.kg⁻¹ body weight (bw)/day of atorvastatin (atorvastatin calcium, PF-00079943-07, Pfizer) diluted in drinking water. Treated water was given in the first bottle of the day and, when drunk, fresh water was given ad libitum. The control group had fresh water ad libitum. Treatment started when the rabbits were 3 month-old. Animals were weighed weekly to adjust treatment. Treatment lasted: 3, 6 and 9 months.

The rabbits were anesthetized by intramuscular injection of ketamine (100 mg.kg⁻¹ bw) and xylazine (10 mg.kg⁻¹ bw). They were then euthanized by an intra-arterial injection of anesthetics (100 mg.kg⁻¹ bw ketamine; 10 mg.kg⁻¹ bw xylazine).

Immediately after euthanasia, the ribcage was open and the heart apex sampled. A part of the heart apex was used as fresh tissue for functional experiments and the other part frozen at -80°C for further studies.

4. Cholesterol quantification

Blood samples were taken monthly from each rabbit in the median artery of the ear. The serum was frozen in liquid nitrogen. The total cholesterol concentrations were measured each month using Siemens reagents on a Siemens Advia 1800 analyzer.

5. Cardiac permeabilized fiber preparation

The permeabilized fiber technique has previously been described in detail [Veksler et al., 1987; Letellier et al., 1992]. The ventricle muscle was minced into fine pieces (approximately 5 mg per piece) and incubated at 4°C in a buffer A (10 mM EGTA, 20 mM Taurine, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM MES potassium, 0.5 mM Dithiothreitol, 15 mM phosphocreatine and 5mM ATP 5 mM; at pH 7.4) containing saponin (100 µg.mL⁻¹). Saponin allows to selectively

destroy the integrity of the sarcolemma while maintaining functionally intact mitochondria. After rinsing, the permeabilized fibers were exposed or not to ROS before oxygen consumption measurement.

6. ROS treatment

A part of the permeabilized fibers were exposed to exogenous ROS by incubating them with FeCl₂/H₂O₂ according to the Fenton reaction ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \bullet\text{OH}$). The technique used was adapted by Farhat et al. (2015) from Walsh et al. (2001). The permeabilized fibers were transferred to buffer A containing 1 mM FeCl₂ and 5 mM H₂O₂ during 30 min at 4°C. The permeabilized fibers which had not been exposed to ROS were incubated in buffer A without H₂O₂ or FeCl₂. After incubation time, the fibers were washed twice for 5 min in buffer A.

7. Oxygen consumption measurement

The oxygen consumption rate was measured at 37°C using a Clark-type electrode (1302 model, stratkelvin, UK) in closed-thermostated oxygraph cuvettes filled with respiratory buffer (20 mM Tris, 150 mM KCl, 0.08 mM EDTA, 10 mM NaH₂PO₄ and 7.5 mM MgCl₂; pH 7.2). First, the basal respiration (V₀) defined as state 4 in mitochondria preparation was assessed by

adding the Krebs cycle intermediates pyruvate/malate (12 mM/6 mM). Then, the maximal ADP-stimulated respiration (V_{max}) defined as state 3 in mitochondria preparation was measured by adding 5 mM ADP. The respiratory substrates (pyruvate/malate and ADP) were used at saturating concentrations [Mortelette et al, 2010]. The oxygen consumption was expressed in nmolO₂.min⁻¹.g⁻¹ of wet weight. The proton leak was evaluated by calculating the ratio (V₀x100)/V_{max} and expressed in %. The vulnerability to ROS was expressed in % of the oxygen consumption variation in exposed vs not exposed fibers.

8. Malondialdehyde (MDA) content in heart

The MDA content, used as an index of lipoperoxidation, was determined by the TBA/MDA complex HPLC quantification according to a method described for rat heart by Léon et al. (2013). The ventricle was homogenized in a 2% methanolic solution with 1% butylhydroxytoluene. In the presence of 1% phosphoric acid, a complex forms between MDA and TBA (7.4 mM) after development of the reaction at 100°C for 30 min. The TBA/MDA complex was extracted in n-butanol, then evaporated at 37°C and the residue was re-dissolved in the mobile phase. The TBA/MDA complex was

separated by HPLC and detected by UV spectrophotometry (BIO-TEK KONTRON) at 532 nm and expressed in nmol.g^{-1} tissue.

9. Antioxidant enzyme activities and protein content in ventricle

Enzyme activities and protein content were determined by UV spectrophotometry (UVIKON XL model) at 37°C.

Samples from frozen tissues were placed in an extraction buffer (75 mM TRIS and 5 mM EDTA) at 4°C and pH 7.4 for homogenization with a Polytron homogenizer prior to centrifugation. After centrifugation of the resulting supernatant at 12,000 g for 10 min at 4°C, the activities of the superoxide dismutase (SOD), the glutathione peroxidase (GPx) and the protein content were determined [Amérand et al., 2005].

- The SOD activity was measured at 480 nm using the method that inhibits the adrenaline-adrenochrome reaction [Misra and Fridovich, 1972]. One unit (U) of SOD is equal to the amount of sample needed to cause 50% inhibition compared with the control (100%). SOD activity is expressed in U.mg^{-1} protein.

- The GPx activity was assessed at 340 nm with an indirect method adapted from [Ross, 2001] Briefly, the GPx activity was determined from the decrease of NADPH induced by a coupled reaction with the

glutathione reductase. The GPx activity was expressed in $\mu\text{mol NADPH oxidized.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein.

- The protein content was measured by the colorimetric method using the BC Assay Protein Quantitation Kit (Uptima-Interchim, France, #FT-40840A). Cu^{2+} is reduced to Cu^+ by proteins in an alkaline medium. The BC Assay (bicinchoninic acid) chelates Cu^+ ions with very high specificity to form a water soluble purple-colored complex. The absorbance of this final Cu^+ complex is measured with a spectrophotometer at 562 nm and is directly proportional to the protein concentration expressed in mg.g^{-1} tissue.

10. Statistical analysis

All the statistical analysis were made with Statistica® software version 10. The normality was tested with Lilliefors's test ($p>0.05$). When the data was gaussian (oxygen consumption results) a two ways ANOVA was used and a Fisher's test was performed as a post-hoc when necessary. When the data was not Gaussian (SOD activity, GPx activity, MDA and total cholesterol concentrations) a Kruskal-Wallis test was performed.

RESULTS

1. Cholesterol

No significant effect of time or treatment was observed on total cholesterol. On the whole experiment, the total cholesterol concentration was $19.43 \pm 3.12 \text{ mmol.L}^{-1}$ in the control group and $18.17 \pm 6.30 \text{ mmol.L}^{-1}$ in the treated group (median \pm IQR).

2. Basal and maximal oxygen consumption

There is a significant reduction of the oxygen consumption with time ($p=0.020$) and treatment ($p=0.033$) on V_0 (Figure 1) but without difference between the control and the treated groups at a given age (Fisher's test $p>0.05$).

In the V_{max} measurement, there is an age effect ($p=0.009$) and an interaction between age and treatment effect ($p<0.001$). Fisher's post ANOVA shows a difference between the control and the treated groups at the age of six, nine and twelve months.

3. Evaluation of proton leak

There is a significant effect of age on the proton leak (see Table I, $p=0.001$ ANOVA2), that would indicate an increase. Nevertheless no effect with treatment or interaction was found ($p>0.05$).

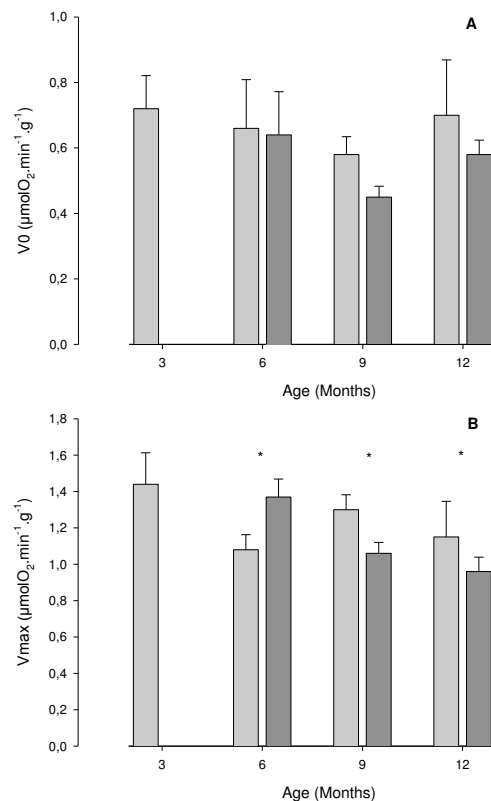


Figure 1: Evolution of the oxygen consumption of permeabilized cardiac fibers in the absence (V_0 , A) and in the presence (V_{max} , B) of ADP, in control group (■) and treated group (■). The data is expressed as mean \pm SD. There is a significant effect of age and treatment on V_0 but post hoc test did not confirm this result (Fisher's test $p>0.05$). There is an age effect and an interaction between time and treatment ($p<0.05$ in ANOVA 2). * indicates a significant difference between the control and the treated groups at the same age (Fisher's test $p<0.05$).

4. Susceptibility to ROS exposure

After ROS exposure (figure 2), a treatment effect ($p=0.036$) and an interaction between time and treatment ($p=0.011$) are visible on V_{max} with a statistical difference between

the control and the treated groups at nine months.

Age (Months)		Proton leak (%)
Control group	3	50.03 ± 2.75
	6	61.74 ± 13.39
	9	45.01 ± 5.53
	12	60.79 ± 11.81
Treated group	3	46.88 ± 10.05
	6	42.46 ± 3.90
	9	60.59 ± 6.84

Table 1: Proton leak in % ((V0x100)/Vmax). The data is expressed as mean ± SD. Time has a significant effect on proton leak (p=0.001). There is no significant difference with treatment or interaction (ANOVA 2 p>0.05).

Table 2: SOD activity, Gpx activity and MDA content in Watanabe rabbit myocardium with or without treatment by atorvastatin at different ages. The data is expressed as median ± IQR. There is no significant difference with age, treatment or interaction (ANOVA 2 p>0.05).

Age (Months)		SOD activity (U _{SOD} ·mg ⁻¹ protein)	Gpx activity (µmol oxidized NADPH·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ protein)	MDA (nmol.g ⁻¹ tissue)
Control group	3	6.73 ± 1.30	7.84 ± 0.42	7.59 ± 1.71
	6	5.32 ± 1.19	6.47 ± 1.64	12.21 ± 2.09
	9	5.90 ± 0.82	7.58 ± 1.10	6.94 ± 3.62
	12	4.44 ± 0.29	6.50 ± 0.50	3.97 ± 0.79
Treated group	3	3.13 ± 1.66	5.68 ± 1.54	7.68 ± 6.44
	6	6.78 ± 1.76	6.47 ± 1.44	7.80 ± 1.17
	9	7.65 ± 1.48	6.95 ± 0.13	12.61 ± 5.47

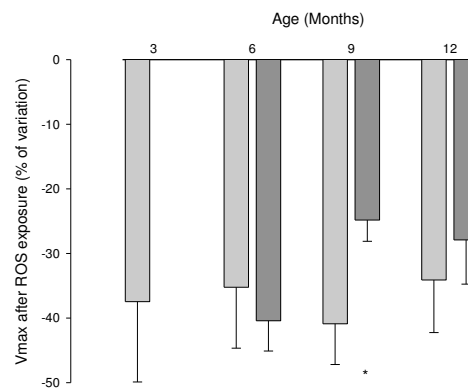


Figure 2: Evolution of the oxygen consumption variation of the permeabilized cardiac fibers in the presence of ADP (Vmax) after ROS exposure (Susceptibility to ROS) in control group (■) and in treated group (■). Results are expressed in % of variation between the oxygen consumption rate before and after ROS exposure according to this formula:

$[(V_{\text{exposed}} - V_{\text{non-exposed}}) / V_{\text{non-exposed}}] \times 100$. The data is expressed as mean ± SD. There is a treatment effect and an interaction between time and treatment (p<0.05, ANOVA 2). * indicates a significant difference between the control and the treated groups at the same age (Fisher's test p<0.05).

5. Effect on antioxidant enzymes activities and MDA content

The results of the SOD activity, GPx activity and MDA content are presented on table 2. No significant difference was observed with age or treatment.

DISCUSSION

Little data is available on the impact of long-term atorvastatin treatment on the oxidative capacity of the myocardium. The purpose of this study is to highlight the possible effects of a long-term and low-dose atorvastatin treatment on myocardial mitochondrial respiration and its susceptibility to ROS. The experiment was conducted on a model of familial hypercholesterolemia and spontaneous atherosclerosis, the Watanabe rabbit. A low-dose atorvastatin treatment was administered over a long period, i.e. between the ages of three months to one year, corresponding to a quarter of the Watanabe life duration [Hatanaka et al., 1987].

The Watanabe rabbit spontaneously develops atherosclerotic plaques very similar to those found in humans [Buja et al., 1983; Shiomi and Ito, 2009] and it can present myocardial infarction from the age of 11 months [Ito et al., 2004]. Here, the statin dose used may be considered as a low dose because no change in serum cholesterol was

observed. However, this dose of statin is sufficient to observe some of its beneficial pleiotropic effects. Indeed, in a parallel study, it has been demonstrated that this dose (in the same animal model) reduces the severity of the progression of atherosclerosis [Tissier et al., 2015]. Given the lack of knowledge on this animal model concerning the myocardial mitochondrial respiration and its susceptibility to ROS, the first step of this study was to determine the evolution of these parameters in time.

The oxygen consumption was measured on permeabilized cardiac fibers in resting condition (V_0) and with maximal ATP production (V_{max}). Our results show a significant decrease in V_{max} with time. This could result from a decrease in mitochondrial density with aging [Barja, 2004] or an accumulation of non-functional damaged mitochondria in the heart [Dai et al., 2012]. On the other hand, this reduction of oxygen consumption may also reflect an alteration of electron transfer along the respiratory chain [Harman, 1956 ; Hagen et al., 2002 ; Barja, 2004].

This alteration of the mitochondrial function could be associated with aging where an increase in ROS production and in free radical attacks is observed in all tissues, including the heart [Judge et al., 2005]. Our study does not provide direct determination

of the ROS production but a quantification of the lipid peroxidation and a measure of some enzymatic antioxidant activities. These parameters were not modified, however, during aging, a lipid peroxidation has been demonstrated [Ji et al., 1991] and the antioxidant systems have been shown to be involved in the control of the overproduction of ROS [Gruber et al., 2013; Schriener et al., 2005]. In our study, animals experience pathological aging but might not be old enough (3 to 12 months) to observe the aging effects on the antioxidant systems. Nevertheless, a proton leak increase could play an antioxidant function through the decrease of the electron leak [Russel et al., 2003; Acuna-Castroviejo et al., 2001]. And in our study such an increase is observed. In a resting metabolic state (V_0) the activity of the mitochondrial electron transport chain is devoted to countering the energy dissipation due to the proton leak, hence the relative importance of V_0 compared to V_{max} is a reflect of the proton leak . In 3 month-old WHHL, V_0 represents about 50% of V_{max} in the heart of watanabe rabbits (a value close to the one found by other authors: Brand et al. 2000; Serviddio et al. 2007). Our results show a significant increase of the proton leak (up to 60% at 12 month). This phenomenon could be the consequence of a decrease of membrane potential during aging due to an increase in UCP2 expression

[Brand, 2000; Newgard and Pessin, 2014; Serviddio et al., 2007]. This proton leak increase may be initially sufficient to limit the potential harmful effects of ROS without increasing in antioxidant enzyme activities. Hence, V_{max} was measured, after incubation or not, with a ROS generating system. On average, V_{max} decreased of about 30 to 40% after free radical attack. This percentage reflects the vulnerability of mitochondrial respiration to free radical. It was not modified in the control group over the duration of the experiment.

This study aims to understand whether mitochondria could implement other adaptative mechanisms during long term atorvastatin treatment. Our study shows that the low doses of atorvastatin significantly decreases V_{max} at the ages of 9 and 12 months. This change may result from a decrease of the electron transport through the respiratory chain: statins are known to inhibit the synthesis of mevalonate [Rutishauser, 2008], a precursor of ubiquinone [Mabuchi et al., 2005] in charge of the transport of electrons from complexes I and II to complex III of the respiratory chain. In addition, complex I can be directly inhibited by statins [Sirvent et al., 2012]. Electrons unsupported by their carrier at this point of the respiratory chain could lead to an increase in the electron leak and, thereby, to an increased ROS production. However,

no modification of the ROS attack was observed through quantification of the lipid peroxidation. The statin treatment used in this study does not seem to modify any antioxidant system (SOD, GPx or proton leak). It is nevertheless important to note that other enzymatic antioxidant (catalase, glutathione reductase) or non-enzymatic (vitamin A, vitamin E, ubiquinone) systems could have been modified by this treatment but were not measured. It has also been demonstrated that statins can inhibit other sources of ROS production as NADPH oxidase [Delbosc et al., 2002]. Hence, the treatment used here (dose and duration) does not seem to present any of the beneficial effects observed in rat heart by Bouitbir et al. (2012).

In spite of this, our experiments have produced very innovative results showing the positive effects of the use of a low dose of statins on heart ROS susceptibility. Measuring V_{max} following exposure to the Fenton reaction made possible to demonstrate that the mitochondrial respiration has a lower susceptibility to ROS after the statin treatment. The interaction between age and treatment shows that, the longer the treatment, the more protective it is. It has been hypothesized that such modification of vulnerability could be linked to an increase in ROS production: it was possible to observe modifications in

mitochondrial susceptibility to ROS under the adaptation to physical exercise, an important ROS producer [Farhat et al., 2015]. The protective effect observed in this study could occur through mitochondrial structural adaptations and/or phospholipids and proteins composition modification. It has already been shown that, for example, CIII is more sensitive to free radical attack than CII [Suematsu et al., 2003]. Moreover, atorvastatin could modify membrane fluidity [Ulicna et al., 2012].

In conclusion, this study aimed to determine potential effects of a low-dose atorvastatin treatment on the myocardium mitochondrial respiration. Our study, in accordance with literature, shows a decrease in the oxidative capacity, an increase in the proton leak and no modification in the mitochondrial susceptibility to ROS during the duration of the experiment. To our knowledge, this is the first study to identify a protective effect of statins against the susceptibility to ROS of the cardiac muscle in the context of a non-hypocholesterolemic long-term treatment. It would be very interesting to verify if this effect is observed in the vessel wall and to explore the hypothesis of a link between this reduced the mitochondrial susceptibility to ROS and the beneficial effects of the statin on CVD.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES

- Acuna-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res.* 2003;30(2):65-74
- Amarenco P, Labreuche J, Lavallée P and Touboul PJ. Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. *Stroke.* 2004; 35:2902-2909
- Amérand A, Vettier A, Sebert P, Cann-Moisan C. In vitro effect of hydrostatic pressure exposure on hydroxyl radical production in fish red muscle. *Redox Rep.* 2005;10(1):25-28
- Barja G. Free radicals and aging. *TRENDS in Neurosciences.* 2004;27(10):595-600
- Boutbir J, Charles AL, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx J, Piquard F, Geny B and Zoll J. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *European Heart Journal.* 2012; 33:1397-1407
- Brand MD. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental gerontology.* 2000;35:811-820
- Buja LM, Kita T, Goldstein JL, Watanabe Y, Brown MS. Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology.* 1983;3(1):87-101
- Delbosq S, Cristol JP, Descomps B, Mimran A, Jover B. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension.* 2002;40:142-147
- Dai DF, Rabinovitch PS, Ungvari Z. Mitochondria and cardiovascular aging. *Circ Res.* 2012 ;110 :1109-1124
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82:47-95
- Farhat F, Dupas J, Amérand A, Goanvec C, Feray A, Simon B, Guegueniat N, Moisan C. Effect of exercise training on oxidative stress and mitochondrial function in rat heart and gastrocnemius muscle. *Redox Report.* 2015;20(2):60-68
- Gruber J, Fong S, Chen CB, Yoong S, Pastorin G, Schaffer S, Cheah I, Halliwell B. Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow

- ageing. *Biotechnology advances*. 2013;31(5):563-592
- Hagen TM, Moreau R, Suh JH, Visioli F. Mitochondrial decay in the aging rat heart. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*2002;959:491-507
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11:298-300
- Hatanaka K, Ito T, Shiomi M, Yamamoto A, Watanabe Y. Ischemic heart disease in the WHHL rabbit: A model for myocardial injury in genetically hyperlipidemic animals. *Am Heart J.* 1987;113:280-288
- Holbrook A, Wright M, Sung M, Ribic C and Baker S. Statin-Associated Rhabdomyolysis: Is There a Dose-Response Relationship? *Canadian Journal of Cardiology.* 2011; 27:146-151
- Ito T, Yamada S, Shiomi M. Progression of coronary atherosclerosis relates to the onset of myocardial infarction in an animal model of spontaneous myocardial infarction (WHHLMI Rabbits). *Exp Anim.* 2004;53(4):339-346
- Jackevicius CA, Chou MM, Ross JS, Shah ND, Krumholz, HM. Generic atorvastatin and health care costs. *N Engl J Med.* 2012; 366:201-204
- Ji LL, Dillon D, Wu E. Myocardial aging: antioxidant enzyme systems and related biochemical properties. *American journal of physiology.* 1991; 261(2):R386-R392
- Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T, Leeuwenburgh C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *Faseb J.* 2005;19:419-421
- Léon K, Moisan C, Amérand A, Poupon G, L'Her E. Effect of induced mild hypothermia on two pro-inflammatory cytokines and oxidative parameters during experimental acute sepsis. *Redox report.* 2013;18(3):120-126
- Letellier T, Malgat M, Coquet M, Moretto B, Parrot-Roulaud F, Mazat JP. Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers. *Ped. Res.* 1992; 32: 17-22
- Lutgens E and Daemen MJAP. HMG-coA reductase inhibitors: lipid-lowering and beyond. *Drug discovery today: therapeutic strategies.* 2004; 1(2):189-194
- Mabuchi H, Higashikata T, Kawashiri M, Katsuda S, Mizuno M, Nohara A, Inazu A, Koizumi J, Kobayashi J. Reduction of serum ubiquinol-10 and Ubiquinone-10 levels by atorvastatin in hypercholesterolemic patients. *Journal of atherosclerosis and thrombosis.* 2005;12(2):111-119

- Misra HP and Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247(10):3170-3175
- Mortelette H, Moisan C, Sebert P, Belhomme M, Amérand A. Fish as a model in investigations about the relationship between oxygen consumption and hydroxyl radical production in permeabilized muscle fibers. *Mitochondrion.* 2010;10(5):555-558
- Newgard CB and Pessin JE. Recent progress in metabolic signaling pathways regulating aging and life span. *Journals of gerontology.* 2014;69(S1):S21-S27
- Ross SW, Dalton DA, Kramer S, Christensen BL. Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2001;130(3):289-303
- Russell A, Wadley G, Hesselink M, Schaart G, Lo S, Léger B, Garnham A, Kornips E, Cameron-Smith, Giacobino JP, Muzzin P, Snow R, Schrauwen P, Less S. UCP3 protein expression is lower in type I, IIa and IIx muscle fiber types of endurance-trained compared to untrained subjects. *Pflügers Archiv.* 2003;445(5):563-569
- Rutishauser J. Effets pleiotropes des statins. *Forum Med Suisse.* 2008 ; 8(10) :187-190
- Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science.* 2005;308:1909-1911.
- Serviddio G, Bellanti F, Romano AD, Tamborra R, Rollo T, Altomare E, Vendemiale G. Bioenergetics in aging: mitochondrial proton leak in aging rat liver, kidney and heart. *Redox report.* 2007;12:91-95
- Shiomi M and Ito T. The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: A tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis.* 2009; 207:1-7
- Sirvent P, Fabre O, Bordenave S, Hilolaire-Buys D, Raynaud De Mauverger E, Lacampagne A, Mercier J. Muscle mitochondrial metabolism and calcium signaling impairment in patients treated with statins. *Toxicology and applied pharmacology.* 2012 ;259 :263-268
- Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N, Takeshita A.

- Oxidative stress mediates tumor necrosis factor- α -induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation*. 2003;107:1418-1423
- Tissier F, Didier R, Lautridou J, Boschat J, Desfontis JC, Mallem Y, Mansourati J, Pichavant-Rafini K, Theron M, Gilard M. Effects of an early and low-dose hypolipidemic treatment of atherosclerosis : an OCT study in Watanabe Rabbits. *Atherosclerosis*. 2015;241:e149-e229
- Tomaszewski M, Stepień KM, Tomaszewska J and Czuczwar SJ. Statin-induced myopathies. *Pharmacological reports*. 2011; 63: 859-866
- Ulicna O, Vancova O, Waczulikova I, Bozek P, Sikurova L, Bada V, Kucharska J. Liver mitochondrial respiratory function and coenzyme Q content in rats on a hypercholesterolemic diet treated with atorvastatin. *Physiol Res*. 2012;61:185-193
- Veksler V, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA, Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim. Biophys. Acta* 1987; 892: 191-196.
- Walsh B, Tonkonogi M, Sahlin K. Effect of endurance training on oxidative and antioxidative function in human permeabilized muscle fibres. *Eur J Physiol*. 2001;442:420-425
- Wassmann S and Nickenig G. Interrelationship of Free Oxygen Radicals and Endothelial Dysfunction—Modulation by Statins. *Endothelium*. 2003; 10:23-33

2. DISCUSSION

Le but de cette étude était de mettre en évidence les éventuels effets d'un traitement à long terme d'atorvastatine, pris précocement et à faible dose, sur la respiration mitochondriale cardiaque et la susceptibilité aux ROS de ce territoire. Nous avons pu observer les effets du développement de l'athérosclérose dans le temps mais aussi avec le traitement. La faible dose d'atorvastatine utilisée n'a pas modifié de façon durable la cholestérolémie sur les 9 mois d'expérimentation. Les effets observés au niveau du traitement sont donc dus aux effets pléiotropes de la statine et non à une réduction des lipides circulants.

La consommation d'oxygène a été mesurée sur des fibres cardiaques perméabilisées. Cette consommation a tout d'abord été mesurée sans stimulation de la production d'ATP (V_0). Dans la mesure où dans cette condition, la chaîne respiratoire mitochondriale ne fonctionne pas pour produire de l'énergie, la consommation d'oxygène permet de maintenir le gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie. Cette première mesure est donc le reflet de la fuite de proton mitochondriale. Dans un deuxième temps, nous avons mesuré la consommation d'oxygène maximale (avec stimulation de la production d'ATP). Dans cette condition de mesure l'ADP et les substrats énergétiques de la mitochondrie sont présents en excès, c'est donc l'activité maximale de la mitochondrie (V_{max}) qui est évaluée. Le rapport V_0/V_{max} représente la fraction de l'activité mitochondriale liée à la fuite de protons.

L'analyse statistique de nos résultats montre met en évidence un effet du temps et du traitement sur V_0 (ANOVA II, $p < 0.05$). Il existe peut-être une tendance à la baisse de V_0 avec un effet plus marqué chez les animaux traités. Néanmoins, ces

effets ne sont pas confirmés par le test post-ANOVA de Fisher. Nous resterons donc prudents sur leur interprétation. L'analyse de V_{\max} confirme l'effet du temps et le test de Fisher met en évidence une diminution de ces consommations maximales d'oxygène chez les animaux traités aux temps 9 et 12 mois. Enfin, la fuite de protons semble augmenter au cours du temps (ANOVA II, $p=0.001$) sans effet du traitement. Il apparaît possible que la diminution de V_{\max} puisse être due à une diminution avec l'âge du nombre de mitochondries [Barja, 2004] ou à une accumulation de mitochondries non fonctionnelles dans le coeur [Dai *et al.*, 2012]. Cette observation semble aussi cohérente avec la théorie du vieillissement. En effet, cette dernière [Harman, 1956], met en évidence une réduction de la capacité oxydative liée à une altération du transport des électrons [Hagen *et al.*, 2002] avec l'âge.

On observe également un effet significatif du traitement sur les consommations d'oxygène. La prise du traitement accentue donc la réduction de la capacité oxydative maximale observée au cours du temps. Cette modification est peut être la conséquence d'une augmentation de la fuite d'électrons. En effet, les statines inhibent la HMG-CoA réductase et par la même la synthèse du mévalonate. Hors, le mévalonate est un précurseur de l'ubiquinone. La réduction de la synthèse du mévalonate par les statines réduit donc la quantité d'ubiquinone en charge du transport des électrons des complexes I et II au complexe III. Il est donc possible que cela augmente la fuite des électrons, puisque ces derniers sont non pris en charge par leur transporteur à cet endroit de la chaîne respiratoire. De plus, le complexe 1 peut être directement inhibé par la statine [Sirvent *et al.*, 2012].

Nos résultats sur la fuite de protons diffèrent des résultats obtenus *in vitro* par Vaughan *et al.* (2013). Ils ont observé une augmentation de la fuite de protons en présence d'une autre statine, la simvastatin. Dans cette étude, le métabolisme

oxydatif basal était pourtant diminué par le traitement. Il peut donc peut-être y avoir des effets variables sur la fuite de protons en fonction de la molécule, de la concentration ou du temps d'exposition.

Dans le cadre du vieillissement et de l'athérosclérose, il apparaît une augmentation de la production de ROS. Pour maintenir des capacités oxydatives suffisantes au fonctionnement cellulaire, la mitochondrie doit donc se préserver de cette potentielle attaque radicalaire. La mesure de la sensibilité aux ROS s'avère être alors un bon indicateur de l'adaptabilité cellulaire vis-à-vis du stress oxydant. Suite à une réaction de Fenton, qui va générer le radical hydroxyle (le plus agressif des ROS), V_0 et V_{max} ont été mesurées et la différence par rapport aux consommations avant exposition a été quantifiée en % de variation. Il apparaît une réduction de la consommation d'oxygène après exposition aux ROS, que ce soit pour V_0 ou pour V_{max} . Ceci va dans le sens d'une attaque radicalaire de la mitochondrie en cas de stress oxydatif.

Nous n'avons pas observé d'effet notable de l'évolution de l'athérosclérose dans le temps sur la sensibilité aux ROS. En revanche, il y a une moins grande susceptibilité aux ROS avec le traitement mise en évidence par la mesure de V_{max} suite à l'exposition à la réaction de Fenton. L'effet significatif de l'interaction entre âge et traitement nous indique que plus le sujet avance en âge, plus cette protection du traitement vis-à-vis de la susceptibilité aux ROS est efficace. Une des hypothèses de la diversité des sensibilités aux ROS est basée sur le niveau d'activité des systèmes anti-oxydants. En effet, les systèmes anti-oxydants ont la capacité de limiter la formation ou la réactivité des ROS et donc de protéger la cellule des attaques radicalaires. Ils sont impliqués dans la lutte contre la surproduction de ROS

lors du vieillissement, notamment au niveau du cœur [Gruber *et al.*, 2013]. Il a par exemple été mis en évidence qu'une surexpression de la catalase permet d'annuler les effets du vieillissement au niveau cardiaque et d'améliorer l'espérance de vie [Schriner *et al.*, 2005]. De plus, l'athérosclérose, qui se met en place tout au long de la vie des individus, conduit à une augmentation du stress oxydatif, classiquement mis en évidence à l'échelle du système cardio-vasculaire par une augmentation du cholestérol oxydé circulant et sous-endothélial et par une modification de la fonction endothéliale en agissant sur la voie du NO. Le myocarde est irrigué par les coronaires qui sont, avec les carotides, les artères touchées en premier par l'athérosclérose et les plus impliquées dans les complications sévères de cette pathologie. Les activités de différentes enzymes anti oxydantes (SOD, GPx) ont donc été mesurées. Aucune modification n'a été constatée sur l'activité de la SOD et de la GPx. Ceci ne veut pas dire que notre traitement n'ait pas d'effet sur les systèmes antioxydants puisque nous n'avons quantifié que l'activité des enzymes et non leur expression. De plus, d'autres systèmes antioxydants enzymatiques (catalase, glutathion réductase) ou non enzymatiques (Vitamine A, vitamine E, Ubiquinone), pourraient être modifiés par notre traitement. Il a également été mis en évidence que les statines peuvent inhiber la voie de l'angiotensine II et de la NADPH oxydase avec une prise à long terme [Delbosc *et al.*, 2002(a)].

Le vieillissement augmente la production de ROS dans le cœur [Judge *et al.*, 2005]. De son côté, l'athérosclérose est aussi à l'origine d'une production d'espèces radicalaires dont les lipides représentent la première cible potentielle. En effet, le stress oxydatif peut modifier les lipides membranaires [Kulig *et al.*, 2015]. Le remodelage des lipides membranaires mitochondriaux fait partie intégrante d'un grand nombre de pathologies, dont les pathologies cardiovasculaires liées à

l'athérosclérose [Monteiro *et al.*, 2013]. La peroxydation lipidique est de plus impliquée dans le développement de l'athérosclérose avec notamment un produit de la peroxydation des lipides membranaires (le 4-hydroxynonanal) qui contribue à la dysfonction mitochondriale et à l'augmentation de la production de ROS [Lee *et al.*, 2006 ; Leonarduzzi *et al.*, 2005]. Il a, d'autre part, été mis en évidence que l'atorvastatine pouvait également modifier la fluidité membranaire [Ulicna *et al.*, 2012]. Pour évaluer la peroxydation lipidique, le MDA a été quantifié. Aucune modification au cours du temps ou avec le traitement n'a été observée. Pour autant, le MDA n'est qu'un indicateur de la peroxydation lipidique parmi d'autres et il serait intéressant de faire des mesures complémentaires et d'évaluer la composition en lipides des membranes.

En conclusion, le résultat majeur de cette étude est que l'atorvastatine peut réduire la susceptibilité mitochondriale aux ROS au niveau du myocarde, et ce sans modification des taux de lipides circulants. A notre connaissance, cette étude est la première à identifier un effet protecteur de la statine sur le muscle cardiaque vis-à-vis de la susceptibilité aux ROS à dose non hypocholestérolémiante prise sur le long terme. Ces résultats contribuent à la connaissance des effets à faible dose d'un traitement qui pourrait voir son utilisation diversifié par rapport à une simple réduction de la cholestérolémie. Ces résultats pourraient être particulièrement intéressants dans le cadre d'un traitement chronique puisqu'un traitement à faible dose de statine pourrait réduire l'effet du vieillissement pathologique en réduisant la sensibilité aux ROS du myocarde.

CONCLUSIONS GENERALES

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité au niveau mondial. Elles reposent essentiellement sur le développement, tout au long de la vie des individus, de plaques d'athérome au niveau des artères. Ces plaques peuvent progressivement réduire le diamètre vasculaire, causant des symptômes type angine de poitrine et être également à l'origine d'accidents cardiovasculaires aigus comme l'accident vasculaire cérébral ou l'infarctus de myocarde. En effet, les plaques peuvent être fragilisées, devenir instables et finir par se rompre, laissant partir dans la circulation leur contenu lipidique et un thrombus pouvant obstruer des vaisseaux de plus faible diamètre en distalité. Après la survenue de l'un de ces événements aigus, une prise en charge médicamenteuse par statine peut être utilisée (prévention secondaire). Ces molécules sont utilisées dans le but de faire baisser les taux de lipides circulant et ont également des effets pléiotropes qui stabilisent la plaque et réduisent le risque de récurrence. Cependant, il a pu être observé des effets indésirables avec l'utilisation des statines. Les statines peuvent aussi être utilisées en prévention primaire, et dans ce contexte, il est important de s'intéresser aux doses administrées, la durée de traitement pouvant être longue. Pour cela, des études chez l'animal sont nécessaires afin d'évaluer les potentiels effets bénéfiques d'un traitement à faible dose (sans modification majeure de la lipidémie).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence différents effets d'un traitement à faible dose d'atorvastatine (2.5mg/Kg/J) pris précocement et à long terme sur le développement de la pathologie athéromateuse et la physiopathologie cardiovasculaire chez le lapin Watanabe. Nous avons observé une très faible et transitoire baisse du cholestérol total sur la période 7-9 mois tout comme une légère baisse des HDL sur la même période. En revanche, aucune

modification des triglycérides n'a été observée, ni aucun effet sur les taux circulants de LDL et LDLox. Ainsi, ce traitement, **sans modification notable de la lipidémie ni induction d'effets délétères**, a tout d'abord permis de **réduire la sévérité** de la pathologie. En effet, l'aorte des animaux contrôles et traités a été observée en tomographie par cohérence optique. L'analyse de l'ensemble des plaques depuis la crosse aortique jusqu'à la bifurcation iliaque a permis de proposer une **nouvelle classification** en fonction de la sévérité observée en OCT et validée en microscopie. Grâce à ce classement, il apparaît une augmentation de la sévérité des plaques avec l'âge et une réduction de la sévérité avec le traitement (absence de la classe la plus sévère à 6 mois). De plus, ce traitement modifie la **localisation** des plaques en limitant l'envahissement de l'aorte aux zones ne présentant pas de bifurcation artérielle. Enfin, avec cette technique d'imagerie, a été mise en évidence une **moindre détection de noyaux lipidiques** à 12 mois chez les individus traités pouvant faire penser à une réduction du nombre de ruptures de plaques pouvant être présentes chez notre modèle.

Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés aux propriétés élastiques des vaisseaux. Nous avons constaté une augmentation de la vitesse de l'onde de pouls avec l'âge qui n'est pas retrouvée chez les individus traités. Il semble donc que le traitement **limite la perte d'élasticité** des artères qui apparaît avec l'âge chez notre modèle. Ceci a été confirmé par la mesure en test de traction statique qui a montré que le traitement **inhibe l'augmentation du module d'Young à faible déformation**. En revanche, ces atteintes structurelles ne modifient pas la fréquence cardiaque ou la pression artérielle, que ce soit chez les animaux contrôles ou les traités. D'un point de vue fonctionnel, la prise de statine **prévient la survenue d'une dysfonction endothéliale** dans les artères de faible calibre. Enfin, d'un point de vue

compositionnel, cette prise de statine **améliore le contenu en élastine** de la paroi vasculaire à 12mois.

Le traitement proposé dans le cadre de cette thèse limite donc la sévérité de la pathologie et modifie certains paramètres structurels et fonctionnels des vaisseaux. Afin d'explorer une partie des causes mécanistiques pouvant induire ces phénomènes, une étude des principaux paramètres de l'inflammation impliqués dans le développement de l'athérosclérose a été menée. En effet, l'athérosclérose est une pathologie pouvant être définie comme une inflammation chronique. La modification de l'importance de cette inflammation et de certaines voies de signalisation dédiées pourraient modifier le développement de la pathologie et la physiologie cardiovasculaire associée. Il apparaît qu'au niveau circulant, l'expression de paramètres inflammatoires impliqués dans les mécanismes d'initialisation de la pathologie comme l'**Interleukine 6** ou la molécule d'adhésion **VCAM-1** soient réduits chez les individus traités par rapport aux contrôles sur la période 7-9 mois. La proportion des plaques représentées par le contenu en macrophages a également pu être quantifiée pour chaque classe de plaque.

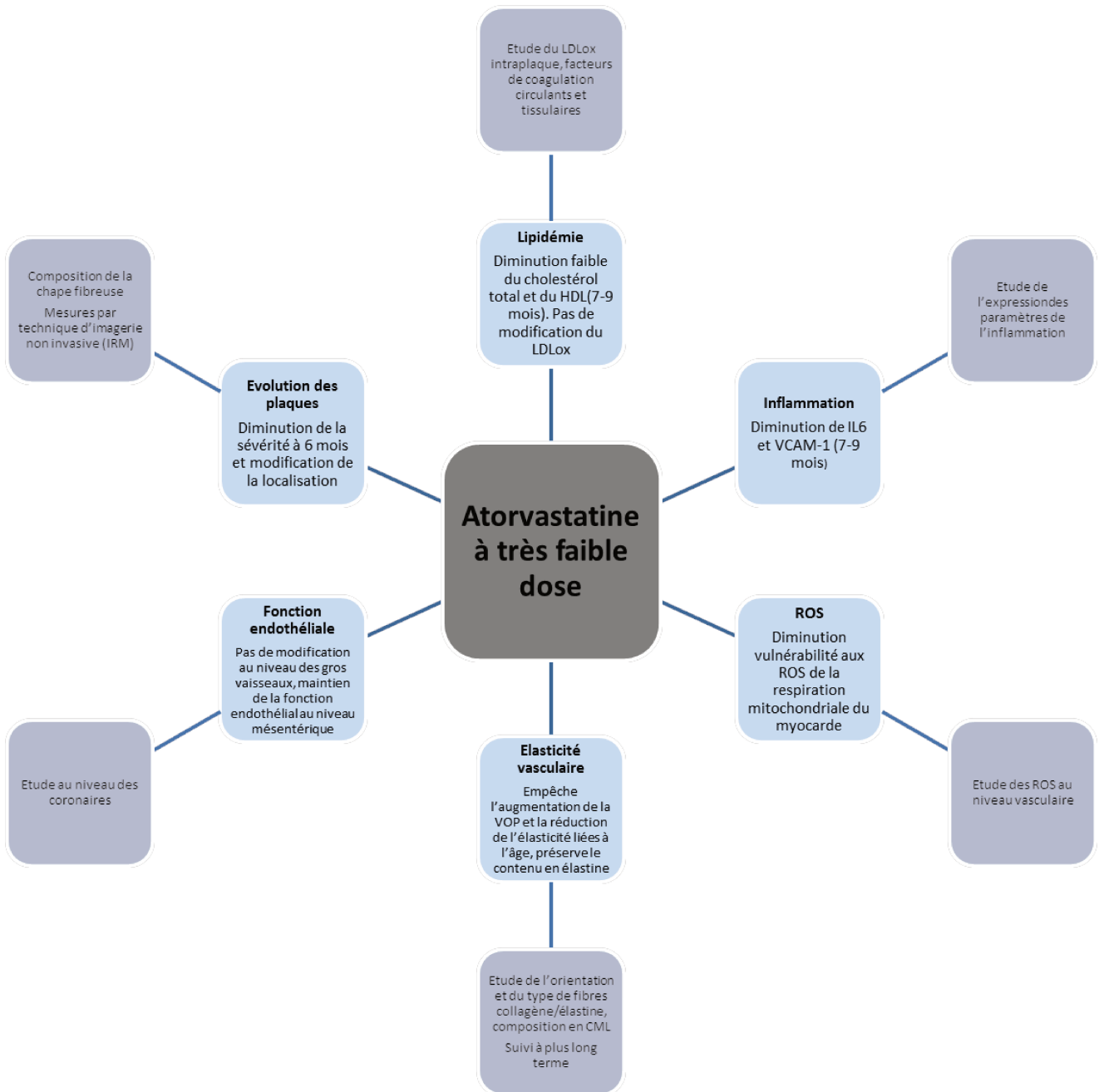
Pour terminer cette étude de la fonction cardiovasculaire, les capacités oxydatives du myocarde ont été testées. Il apparaît une diminution des consommations d'oxygène des fibres cardiaques perméabilisées avec l'âge et le traitement ainsi qu'une augmentation de la fuite de proton avec l'âge. La peroxydation lipidique et l'activité de certains systèmes antioxydant enzymatiques ne sont pas modifiées. En revanche, il apparaît qu'avec le traitement il y a une **réduction de la vulnérabilité aux ROS** du myocarde. **Grâce à ce travail de thèse, il apparaît donc que l'utilisation des statines à des doses non hypo-**

lipidémiantes peut apporter un bénéfice aux individus vulnérables vis-à-vis du risque cardiovasculaire (Figure 32).

Ces résultats pourraient contribuer à une réflexion sur l'utilisation des statines dans un contexte clinique. Jusqu'à présent, les statines prescrites avaient pour objectif de baisser le cholestérol circulant de manière significative. C'est d'ailleurs sur ce critère que la posologie est adaptée à chaque patient dans une fourchette de dose recommandée. Avec cette approche, les statines ont montré des effets particulièrement intéressants dans un contexte de prévention secondaire (après le premier accident cardiovasculaire) pour limiter le risque de récurrence de ces événements aigus [Hebert *et al.*, 1997 ; Schwartz *et al.*, 2001 ; 4S group, 1994]. A l'heure actuelle, les statines sont aussi utilisées en prévention primaire. Des études cliniques ont été menées pour comparer les effets d'une faible dose en comparaison de l'utilisation d'une forte dose, bien que ces deux doses aient toujours un effet hypocholestérolémiant [Yu *et al.*, 2007 ; Mora *et al.*, 2012]. D'autres approches de l'utilisation des statines sont également utilisées et notamment en association avec d'autres molécules. En Chine par exemple, un traitement combiné est souvent proposé, en prévention primaire comme secondaire : le « PAS therapy ». Ce traitement allie trois substances : Probucol, Aspirine, Statine (atorvastatine) [Adhikari *et Meng*, 2012].

Les expérimentations en recherche fondamentale réalisées au cours de cette thèse pourraient contribuer à la réflexion qui semble s'instaurer autour de l'utilisation des statines. Pour aller plus loin dans l'étude des propriétés d'un traitement à très faible dose de statine, des études complémentaires pourraient être menées chez l'animal avec des mesures au niveau de la plaque sur les potentielles modifications de la composition de la chape fibreuse, de l'oxydation des LDL, des facteurs de la

coagulation, des ROS et surtout de l'inflammation/adhésion. L'étude de l'élasticité vasculaire pourrait être complétée par l'étude de l'orientation et du type de fibres de collagène et d'élastine mais aussi la composition de la paroi en cellules musculaires lisses. Aux vues de la forte incidence de la pathologie au niveau cardiaque, une étude fonctionnelle au niveau des coronaires semble également une perspective d'étude intéressante. Enfin, il faut garder en mémoire qu'au cours de ce travail de thèse, une seule statine a été testée (l'atorvastatine) et à une seule concentration sur des lapins Watanabe de 3 à 12 mois. Il pourrait être pertinent d'augmenter la durée de l'étude afin de se situer dans un contexte de vieillissement des individus et déterminer, en particulier, si les effets qui semblent se mettre en place au niveau de l'élasticité vasculaire perdurent dans le temps. L'étude d'autres statines ou d'une combinaison avec d'autres molécules (notamment certains fibrates) pourrait permettre de compléter cette approche expérimentale, tout comme l'introduction de modifications des habitudes de vie (alimentation, exercice, etc). De plus, dans un contexte à visée clinique, le développement de méthodes d'études non invasives pour le suivi des paramètres mesurés permettrait de se rapprocher des besoins médicaux. Une étude en IRM a été initiée en ce sens. Enfin, les effets bénéfiques observés sur notre modèle animal devraient être confrontés avec des résultats d'études cliniques sur l'utilisation de statine à dose non-hypocholestérolémiante.



- Paramètres étudiés et effets observés
- Perspectives d'étude

Figure 32: Schéma bilan des mesures effectuées et des perspectives d'étude.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Adhikari BK and Meng X. Challenges of PAS therapy for coronary atherosclerotic plaque reversal. *Heart*. 2012;98(Suppl2)E1-E319: E167 => pour la discussion, enlevé de la partie "nouvelle utilisation des statines"
- Ait-Oufella H, Tedgui A, Mallat Z. L'athérosclérose : une maladie inflammatoire. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2008; 20(1) :25-33
- Aliev G, Burnstock G. Watanabe rabbits with heritable hypercholesterolaemia: a model of atherosclerosis. *Histol Histopathol*. 1998;13:797-817
- Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis and thrombosis*. 1991; 11:1223-1230
- Andrews TC, Ballantyne CM, Hsia JA, Kramer JH. Achieving and maintaining National Cholesterol Education Program low-density lipoprotein cholesterol goals with five statins. *Am J Med*. 2001; 111:185-191
- Arai T, Hiromatsu K, Nishimura H, Kimura Y, Kobayashi N, Ishida H, Nimura Y, Yoshikai Y. Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during salmonella infection. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995; 213(2):600-607
- Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML, Buccheri V, Souza J, Nicolau JC, Ramires JAF, Serrano CV. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*. 2004;177:161-166
- Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML, Buccheri V, Souza J, Nicolau JC, Ramires JAF, Serrano CV. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*. 2004;177:161-166
- Ashworth JL, Sherratt MJ, Rock MJ, Murphy G, Shapiro SD, Shuttleworth CA, Kielty CN. Fibrillin turnover by metalloproteinases : implications for connective tissue remodeling. *Biochem J*. 1999;340:171-181
- Asmar R, Benetos A, Topouchian J, Laurent P, Pannier B, Brisac AM, Target R, Levy BI. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension*. 1995 ;26 :485-490
- Assoul N, Flaud P, Chaouat M, Letourneur D, Bataille I. Mechanical properties of rat thoracic and abdominal aortas. *Journal of Biomechanics*. 2008;41:2227-2236
- Austrup F, Vestweber D, Borges E, Lohning M, Brauer R, Herz U, Renz H, Hallmann R, Scheffold A, Radbruch A, Hamann A. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature*. 1997; 385:81-83

B

- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants and aging. *Cell*. 2005 ;120 :483-495
- Ballard KD, Taylor BA, Capizzi JA, Grimaldi AS, White CM, Thompson PD. Atorvastatin treatment does not alter pulse wave velocity in healthy adults. *International scholarly research notices*. 2014:5p
- Barja G. Free radicals and aging. *TRENDS in Neurosciences*.2004;27(10):595-600
- Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium : characterization and comparison with the actions of interleukin1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83:4533-4537
- Bhakdi S, Dorweiler B, Kirchmann R, Torzewski J, Weise E, Trantum-Jensen J, Walev I, Wieland E. On the pathogenesis of atherosclerosis : enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J Exp Med*. 1995; 182 :1959-1971
- Biasucci LM, D'Onofrio G, Liuzzo G, Zini G, Monaco C, Caligiuri G, Tommasi M, Rebuffi AG, Maseri A. Intracellular neutrophil myeloperoxidase is reduced in unstable angina and acute myocardial infarction but its reduction is not related to ischemia. *JACC*. 1996; 27(3):611-616
- Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuffi AG, Buffon A, Summaria F, Ginnetti F, Fadda G, Maseri A. Elevated levels of c-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation*. 1999; 99:855-860
- Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuffi AG, Ciliberto G, Maseri A. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation*. 1996; 94:874-877
- Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering are they clinically relevant? *European Heart Journal*. 2003;24:225-248
- Bonnet J. Statines et Plaques. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*. 2012;4:284-290
- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998; 394:894-897
- Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction. The Rotterdam study. *Circulation*. 1997;96:1432-1437
- Boutbir J. Etude des effets des statines sur la fonction mitochondriale des muscles cardiaque et squelettique. *Thèse de l'université de Strasbourg*. Décembre 2010
- Boullier A, Bird DA, Chang MK, Dennis EA, Friedman P, Gillotte-Taylor K, Horkko S, Palinski W, Quehenberger O, Shaw P, Steinberg D, Terpstra V, Witztum JL. Scavenger Receptor,

- oxidized LDL and atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;947:214-223
- Boutouyrie P and Laurent S. Remodelage des grosses et petites artères dans l'hypertension artérielle. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2004 ; 16(2) :81-9
- Brezinski ME, Tearney GJ, Bouma BE, Izatt JA, Hee MR, Swanson EA, Southern JF, Fujimoto JG. Optical coherence tomography for optical biopsy: properties and demonstration of vascular pathology. *Circulation*. 1996;93(6):1206-1213
- Brown MS and Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Review Biochem*. 1983; 52:223-261
- Buja LM, Kita T,Goldstein JL, Watanabe Y, Brown MS. Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1983;3:87-101
- Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *The new England journal of medicine*. 1997;336:1276-1282
- Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, Díaz C, Hernández G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *JACC*.1998;32:2057-2064

C

- Calabro P, Golia E, Yeh ETH. CRP and the risk of atherosclerosis events. *Semin Immunopathol*. 2009; 31:79-94
- Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest*. 2002; 109:745-753
- Carlier S, Kakadiaris IA, Dib N, Vavuranakis M, O'Malley SM, Gul K, Hartley CJ, Metcalfe R, Mehran R et al. Vasa vasorum imaging: a new window to the clinical detection of vulnerable atherosclerotic plaques. *Current atherosclerosis report*. 2005;7(2):164-169
- Carmena R, Duriez P, Fruchart JC. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109: III2-7
- Charo IF and Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England Journal of Medicine*. 2006; 354(6):610-621
- Chatzizisis YS, Coskun A U, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *JACC*. 2007; 49: 2379-2393

- Cheng WH, Ho WY, Chang CF, Lu PJ, Cheng PW, Yeh TC, Hong LZ, Sun GC, Hsiao M and Tseng CJ. Simvastatin induces a central hypotensive effect via Ras-mediated signaling to cause eNOS up-regulation. *Br J Pharmacol.* 2013;170(4):847-858
- Chisolm GM, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. *The journal of biological chemistry.* 1999; 274(37):25959-25962
- Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiological Reviews.* 2001; 91: 327-387
- Choudhary S, Higgins CL, Chen IY, Reardon M, Lawrie G, Vick GW, Karmonik C, Via DP, Morrisett JD. Quantification and localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid endarterectomy tissues. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology.* 2006; 26:2351-2358
- Cobbold CA, Sherratt JA, Maxwell SRJ. Lipoprotein oxidation and its significance for atherosclerosis: a mathematical approach. *Bulletin of mathematical biology.* 2002;64:65-95
- Cocheme HM, Quin C, McQuaker SJ, Cabreiro F, Logan A, Prime TA, Abakumova I, Patel JV, Fearnley IM, James AM, Porteous CM, Smith RAJ, Saeed S, Carre JE, Singer M, Gems D, Hartley RC, Patridge L, Murphy MP. Measurement of H₂O₂ within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell Metab.* 2011;13:340-50
- Cohen SBA, Crawley JB, Kahan MC, Feldmann M, Foxwell BMJ. Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2. *Immunology.* 1997; 92:1-5
- Cottart CH, Lagullier C, Nivet-Antoine V, Klimczak C, Sebban C, Beaudoux JL. Biologie du vieillissement artériel et artériosclérose. *C.R. Biologies.* 2009;332:433-447
- Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques. *Circulation.* 2001;103:926-933
- CTT (Cholesterol Treatment Trialist's) collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials. *Lancet.* 2010;376:1670-1681
- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:5134-5138

D

- D'Autreaux B and Toledano MB. ROS as signalling molecules : mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews*. 2007;8:813-824
- Dai DF, Rabinovitch PS, Ungvari Z. Mitochondria and cardiovascular aging. *Circ Res*. 2012 ;110 :1109-1124
- Dalessandri KM, Eisele P, Wong TS, Parker J and Rucker RB (1994). Elastin degradation in the aorta of Watanabe hereditary hyperlipidemic rabbits. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1994;74:117-120
- Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J*. 1993;69:377-381
- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; *Circulation*, 109(23 suppl 1):III27- III 32
- Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 2004;109:III39-III43
- de Beer FC, Hind CRK, Fox KM, Allan RM, Maseri A, Pepys MB. Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br Heart J*. 1982; 47:239-243
- De Dreuille O, Maszelin P, Foehrenbach H, Bonardel G, Gaillard JF. Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP). *Encycl Med Chir*. Radiodiagnostic principes et techniques d'imagerie. 2002 35-310-A-10. 22p
- de Jaeger C and Cherin P. Matrice extracellulaire, physiologie et vieillissement vasculaire. *Médecine et longévité*. 2012 ;4 :41-53
- De Kleijn D, Pasterkamp G. Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiovascular research*. 2003; 60:58-67
- De Winther MPJ, van Dijk KW, Havekes LM, Hofker MH. Macrophage scavenger receptor class A a multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:290-297
- Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. *Lavoisier*. 2005 : 549p
- Delbosc S, Cristol JP, Descomps B, Mimran A, Jover B. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension*. 2002 (a);40:142-147
- Delbosc S, Morena M, Djouad F, Ledoucen C, Descomps B, Cristol JP. Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, are able to reduce superoxide anion production by NADPH Oxidase in THP-1-derived monocytes. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2002(b); 40:611-617

- Di Vito L, Prati F, Arbustini E, Crea F, Maeri A. A “stable” coronary plaque rupture documented by repeated OCT studies. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2013;6(7):835-836
- Dobrynin AV and Carillo JMY. Universality in nonlinear elasticity of biological and polymeric networks and gels. *Macromolecules*. 2011;44:140-146
- Douglas G et Channon K. M. The pathogenesis of atherosclerosis. *Medicine*. 2010;38(8):397-402
- Duprez DA. Systolic hypertension in the elderly: addressing an unmet need. *Am J Med*. 2008;121:179-184

E

- Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions. A possible pathway for plaque activation. *Circulation*. 2002;105:1158-1161
- Endo A, Kuroda A, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, AND ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by penicillium citrinum. *J Antibiot* 1976;29:1346-1348
- Endo A. The discovery and development of HMGCoA reductase inhibitors. *Journal of Lipid Research*. 1992;33:1569-1582

F

- Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995 ; 92:657-671
- Fan J, Kitajima S, Watanabe T, Xu J, Zhang J, Liu E, Chen YE. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacology and Therapeutics*. 2014:1-16
- Farrar DJ, Bond MG, Riley WA, Sawyer JK. Anatomic correlates of aortic pulse wave velocity and carotid artery elasticity during atherosclerosis progression and regression in monkeys. *Circulation*. 1991;83:1754-1763
- Fayad ZA and Fuster V. Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. *Circulation research*. 2001;89:305-316
- Fehr T, Kahlert C, Fierz W, Joller-Jemelka HI, Riesen WF, Rickli H, Wuthrich RP, Ammann P. Statin- induced immunomodulatory effects on human T cells in vivo. *Atherosclerosis*. 2004;175:83- 90
- Fhayli W, Ghandour Z, Mariko B, Pezet M, Faury G. Rôle de l'élastine et des microfibrilles de la paroi artérielle au cours du développement et du vieillissement: complémentarité ou opposition? *Biologie aujourd'hui*. 2012 ;206(2) :87-102
- Flamment M, 2009. Métabolisme énergétique mitochondrial dans le développement de la stéatose hépatique. Doctorat, Université d'Angers

- Franklin SS, Gustin WT, Wong ND, Larson MG, Weber MA, Kannel WB, Levy D. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure, the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1997;96:308-315
- Friedman GD, Klatsky AL, Siegelau AB. The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1974; 290:1275-1278
- Fujimoto JG and Drexler W. Optical Coherence Tomography: technology and applications. *Springer science and business media*. Décembre 2008: 1346 pages
- Fujimoto JG. Optical coherence tomography. *Comptes rendus de l'Academie des sciences-series IV-Physics*. 2001;2(8) :1099-1111
- Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, Hill CC, Enomoto M, Hirouchi Y, Shiomi M and Aikawa M. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation*. 2001;103:993-999
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;28:373-376
- Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque. Part1: evolving concepts. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(6):937-954

G

- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinase and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1994; 94:2493-2503
- Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*. 2012;32:1104-1115
- Giannopoulos S, Katsanos AH, Tsivgoulis G and Marshall RS. Statins and cerebral hemodynamics. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2012; 32:1973-1976
- Gimbrone MA. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *American journal of pathology*. 1999;155(1):1-5
- Gojova A, Brun V, Esposito B, Cottrez F, Gourdy P, Ardouin P, Tedgui A, Mallat Z, Groux H. Specific abrogation of transforming growth factor- β signaling in T cells alters atherosclerotic lesion size and composition in mice. *Blood*. 2003; 102:4052-4058
- Gong X, Ma Y, Ruan Y, Fu G, Wu S. Long-term atorvastatin improves age-related endothelial dysfunction by ameliorating oxidative stress and normalizing eNOS/iNOS imbalance in rat aorta. *Exp Gerontol*. 2014;52:9-17

- Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rolling BJ, Charo IF. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest.* 1999; 103:773-778
- Gruber J, Fong S, Chen CB, Yoong S, Pastorin G, Schaffer S, Cheah I, Halliwell B. Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing. *Biotechnology advances.* 2013;31(5):563-592
- Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986;320:454-456
- Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Molecular Cell.* 1998; 2:275-281
- Gupta S, Pablo AM, Jiang XC, Wang N, Tall AR, Schindler C. INF- γ potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest.* 1997; 99:2752-2761
- Guzik TJ, West NEJ, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase. Association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res.* 86:e85-e90.

H

- Hagen TM, Moreau R, Suh JH, Visioli F. Mitochondrial decay in the aging rat heart. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*2002;959:491-507
- Hakamada- Taguchi R, Uehara Y, Kuribayashi K, Numabe A, Saito K, Negoro H, Fujita T, Toyo-oka T, Kato T. Inhibition of hydroxymethylglutaryl- coenzyme a reductase reduces Th1 development and promotes Th2 development. *Circ Res.* 2003;93:948-56
- Hallab M, Pichierri S, Chevalet P, De Decker L, Berrut G. La rigidité artérielle, un nouveau facteur de risque à mesurer. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil.* 2012 ;10(3) :235-243
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956;11:298-300
- Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH, Heimovitz H, Cohen HJ, Wallace R. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the Elderly. *Am J Med.* 1999;106:506-512
- Harry BL, Sanders JM, Feaver RE, Lansey M; Deem TL, Zarbock A, Bruce AC, Pryor AW, Gelfand BD, Blackman BR, Schwartz MA, Ley K. Endothelial cell PECAM-1 promotes atherosclerotic lesions in areas of disturbed flow in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:2003-2008

- Hebert PR, Gaziano JM, Chan KS, Hennekens CH. Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality. An overview of randomized trials. *JAMA*. 1997;278(4):313-321
- Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci*. 1981; 78(10):6499-6503
- Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*. 1983; 3:149-159
- Holowatz LA, Santhanam L, Webb A, Berkowitz DE and Kenney WL. Oral atorvastatin therapy restores cutaneous microvascular function by decreasing arginate activity in hypercholesterolaemic humans. *J Physiol*. 2011;589(8):2093-2103
- Holzappel GA. Determination of material models for arterial walls from uniaxial extension tests and histological structure. *Journal of Theoretical Biology*. 2006;238:290-302
- Hong MK, Park DW, Lee CW, Lee SW, Kim YH, Kang DH, Song JK, Kim JJ, Park SW, Park SJ. Effects of statin treatments on coronary plaques assessed by volumetric virtual histology intravascular ultrasound analysis. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2:679- 88.
- Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, Fujimoto JG. Optical Coherence Tomography. *Science*. 1991;254:1178-1181

I

- Imanishi T, Ikejima H, Tsujioka A, Kuroi A, Kobayashi K, Shiomi M, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T. Combined effects of an 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor and angiotensin II receptor antagonist on nitric oxide bioavailability and atherosclerotic change in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Hypertens Res*. 2008(b);31:1199-1208
- Imanishi T, Kuroi A, Ikejima H, Kobayashi K, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor antagonist combination on nitric oxide bioavailability and atherosclerotic change in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Hypertens Res*.2008(a);31:575-584
- Ingueneau C. Régulation de la signalisation calcique dans l'apoptose induite par les lipoprotéines oxydées. Implication dans l'athérosclérose. *Doctorat de l'université de Toulouse*. 2010
- Inoue I, Inaba T, Motoyoshi K, Harada K, Shimano H, Kawamura M, Gotoda T, Oka T, Shiomi M, Watanabe Y, Tsukada T, Yazaki Y, Takaku F, Yamada N. Macrophage colony

- stimulating factor prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*. 1992;93:245-254
- Insull W. The pathology of atherosclerosis : plaque development and plaque responses to medical treatment. *The American journal of medicine*. 2009;122(1S):3-14
- Ip J, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: Role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *JACC*. 1990;15(7):1667-1687
- Ito T, Yamada S, Shiomi M. Progression of coronary atherosclerosis relates to the onset of myocardial infarction in an animal model of spontaneous myocardial infarction (WHHLMI rabbits). *Exp. Anim*. 2004;53(4):339-346

J

- Jackson C, Benbow U, Bond A, Galley D, Schwartz C. Animal models of atherosclerosis. *Advances in vascular medicine*. Chapter 4. Eds D. Abraham et al. 2010:77-91
- Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2003; 57:195-202
- Jacob MP. Matrice extracellulaire et vieillissement vasculaire. *Medecine/Sciences*. 2006 ;22 :273-278
- Jain MK and Ridker PM. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nature reviews*. 2005;4:977-987
- Janeway CA and Medzhitov R. Innate immune recognition. *Ann Rev Immunol*. 2002; 20:197-216
- Jang I K, Bouma B E, Kang D H, Park S J, Park S W, Seung K B, Choi KB, Shishkov M, Schlendorf K, Pomerantsev E Houser SL, Aretz T, Tearney G J. Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound. *JACC*. 2002;39:604-609
- Jang IK, Tearney GJ, MacNeill B, Takano M, Moselewski F, Iftima N, Shishkov M, Houser S, Aretz HT, Halpern EF, Bouma BE. In vivo characterization of coronary atherosclerotic plaque by use of optical coherence tomography. *Circulation*. 2005;111:1551-1555
- Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of physiology and pharmacology*. 2004;55(3):503-517
- Jia H, Abtahian F, Aguirre AD, Lee S, Chia S, Lowe H, Kato K, Yonetsu T, Vergallo R, Hu S, Tian J, Lee H, Park SJ, Jang YS, Raffel OC, Mizuno K, Uemura S, Itoh T, Kakuta T, Choi SY, Dauerman HL, Praad A, Toma C, McNulty I, Zhang S, Yu B, Fuster V, Narula J, Virmani R, Jang IK. In vivo diagnosis of plaque erosion and calcified nodule in patients

- with acute coronary syndrome by intravascular optical coherence tomography. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013; 62(19):1748-1758
- John S, Delles C, Jacobi J, Schlaich MP, Schneider M, Schmitz G, Schmieder RE. Rapid improvement of nitric oxide bioavailability after lipid-lowering therapy with cerivastatin within two weeks. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:1351-1358
- Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *American journal of pathology*. 1994; 144(5):952-961
- Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T, Leeuwenburgh C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfirillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *Fased*. 2005;19:419-421
- Jukema JW, Cannon CP, De Craen AJM, Westendorp RGJ and Trompet S. The Controversies of statin therapy, weighing the evidence. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(10):875-881

K

- Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, Caldwell RW. Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:234-241
- Karimi A, Navidbakhsh M, Shojaei A. A combination of histological analyses and uniaxial tensile tests to determine the material coefficients of the healthy and atherosclerotic human coronary arteries. *Tissue and Cell*. 2015;47:152-158
- Keaney JF, Simon DI, Freedman JE. Vitamin E and vascular homeostasis: implications for atherosclerosis. *FASEB J*. 1999;13:965-976
- Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM. Modified low density lipoprotein and its constituent augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1995; 95:1262-1270.
- Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *Journal of Cell Science*. 2002;115:2817-2828
- Kielty CM, Woolley DE, Whittaker SP, Shuttleworth CA. Catabolism of intact fibrillin microfibrils by neutrophil elastase, chymotrypsin and trypsin. *FEBS Lett*. 1994;351:85-89
- Kita T, Brown MS, Watanabe Y, Golstein JL. Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78 : 2268-2272
- Kitabata H, Tanaka A, Kubo T, Takarada S, Kashiwagi M, Tsujioka H, Ikejima H, Kuroi A, Kataiwa H, Ishiashi K, Komukai K, Tanimoto T, Ino Y, Hirata K, Nakamura N, Mizukoshi

- M, Imanishi T, Akasaka T. Relation of microchannel structure identified by optical coherence tomography to plaque vulnerability in patients with coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology*. 2010;105(12):1673-1678
- Kiyan J, Kusch A, Tkachuk S, Kramer J, Haller H, Dietz R, Smith G, Dumler I. Rosuvastatin regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in vascular remodeling: role for the urokinase receptor. *Atherosclerosis*. 2007;195:254-61
- Clouche M, Rose-John S, Schmiedt W, Bhakdi S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation and proliferation. *Circulation*. 2000; 101:1799-1805
- Kobayashi T, Ito T, Shiomi M. Roles of the WHHL rabbit in translational research on hypercholesterolemia and cardiovascular diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011:1-10
- Kockx MM, Cromheeke KM, Knaapen MW, Bosmans JM, De Meyer GRY, Herman AG, Bult H. Phagocytosis and Macrophage Activation Associated With Hemorrhagic Microvessels in Human Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:440-446
- Koike T, Liang J, Wang X, Ichikawa T, Shiomi M, Sun H, Watanabe T, Liu G, Fan J. Enhanced aortic atherosclerosis in transgenic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits expressing lipoprotein lipase. *Cardiovascular research*. 2005;65:524-534
- Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, Haider N, Farb A, Hui-Liang Y, Smialek J, Renu V. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *American Journal of Pathology*. 2000; 157(4):1259-1268
- Kontopoulos AG, Athyros VG, Pehlivanidis AN, Demitriadis DS, Papageorgiou AA, Boudoulas H. Long-term treatment effect of atorvastatin on aortic stiffness in hypercholesterolaemic patients. *Current medical research and opinion*. 2003;19(1):22-27
- Kubo T, Imanishi T, Takarada S, Kuroi A, Ueno S, Yamano T, Tanimoto T, Matsuo Y, Masho T, Kitabata H, Tsuda K, Tomobuchi Y, Akasaka T. Assessment of culprit lesion morphology in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:933-939
- Kubo T, Tanaka A, Ino Y, Kitabata H, Shiono Y, Akasaka T. Assessment of coronary atherosclerosis using optical coherence tomography. *J Atheroscler Thromb*. 2014;21(9):895-903
- Kulig W, Olzynska A, Jurkiewicz P, Kantola AM, Komulainen S, Manna M, Pourmoussa M, Vazdar M, Cwiklik L, Rog T, Khelashvili G, Harries D, Telkki VV, Hof M, Vattulainen I, Jungwirth P. Cholesterol under oxidative stress- how lipid membranes sense oxidation as cholesterol is being replaced by oxysterols. *Free radical biology and medicine*. 2015;84:30-41

- Kume T, Akasaka T, Kawamoto T, Okura H, Watanabe N, Toyota E, Neishi Y, Sukmawan R, Sadahira Y, Yoshida K. Measurement of the thickness of the fibrous cap by optical coherence tomography. *American Heart Journal*. 2006(a);152(4):755.e1-755.e4
- Kume T, Akasaka T, Kawamoto T, Ogasawara Y, Watanabe N, Toyota E, Neishi Y, Sukmawan R, Sadahira Y, Yoshida K. Assessment of coronary arterial thrombus by optical coherence tomography. *Am J Cardiol*. 2006(b);94:1713-1717
- Kume T, Akasaka T, Kawamoto T, Watanabe N, Toyota E, Neishi Y, Sukmawan R, Sadahira Y, Yoshida K. Assessment of coronary intima-media thickness by optical coherence tomography. Comparison with intravascular ultrasound. *Circ J*. 2005;69:903-907
- Kusters H.M.D, Tegtmeier J, Schurgers J.L, Reutelingsperger P.M.C. Molecular imaging to identify the vulnerable plaque-from basic research to clinical practice. *Molecular imaging and biology*. 2012;14:523-533

L

- Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest*. 1995; 96:2304-2310
- Lakatta EG and Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises. Part I: Aging arteries: A “set up” for vascular disease. *Circulation*.2003;107:139-146
- Laufs U and Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *The journal of biological chemistry*. 1998;273(37):24266-24271
- Laufs U. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol*. 2003;58:719-731
- Laurent S, Cockcroft J, Bortel LV, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I and Struijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *European Heart Journal*. 2006; 27:2588-2605
- Lee JY, Jung GY, Heo HJ, Yun MR, Park JY, Bae SS, Hong KW, Lee WS, Kim CD. 4-Hydroxynonenal induces vascular smooth muscle cell apoptosis through mitochondrial generation of reactive oxygen species. *Toxicol Lett*. 2006;166:212-221
- Lehman ED, Hopkins KD, Gosling RG. Aortic compliance measurement using Doppler ultrasound: in vivo biochemical correlates. *Ultrasound Med Biol*. 1993;19:683-710
- Lehman ED. Clinical value of aortic pulse-wave velocity measurement. *Lancet*. 1999;354:528-529

- Lehr HA, Seemuller J, Hubner C, Menger MD, Messmer K. Oxidized LDL-induced leukocyte/endothelium interaction in vivo involves the receptor for platelet-activating factor. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology*. 1993; 13:1013-1018
- Leonarduzzi G, Chiarpotto E, Biasi F, Poli G, 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Molecular nutrition & food research*. 2005; 49(11): 1044-1049
- Li Q and Cathcart MK. Selective inhibition of cytosolic phospholipase A2 in activated human monocyte. Regulation of superoxide anion production and low density lipoprotein oxidation. *The journal of biological chemistry*. 1997; 272(4):2404-2411
- Li S, Liang J, Niimi M, Waqar AB, Kang D, Koike T, Wang Y, Shiomi M, Fan J. Probucol suppresses macrophage infiltration and MMP expression in atherosclerotic plaques of WHHL rabbits. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2014;21(7):648-658
- Liao JK et Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89-118
- Liao JK. Endothelium and acute coronary syndromes. *Clinical Chemistry*. 1998;44:1799-1808
- Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001;104:365-372
- Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. TH1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunology Today*. 1995; 16:34-38
- Lipson EH, Viseskul C, Herrmann J. The clinical spectrum of congenital contractural arachnodactyly. *Zeitschrift fur Kinderheikunde*. 1974;118(1):1-8
- Liu J, Yang F, Yang XP, Jankowski M, Pagano PJ. NAD(P)H oxidase mediates angiotensin II-induced vascular macrophage infiltration and medial hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:776-782
- Liuzzo G, Biasucci LM, Callimore JR, Grillo RL, Rebuszi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of c-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *The new England journal of medicine*. 1994;331(7):417-424
- Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, Weyand CM. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000; 102:2883-2888
- Lopez JJ, Arain SA, Madder R, Parekh N, Shroff AR, Westerhausen. Techniques and best practices for optical coherence tomography: A practical manual for interventional cardiologists. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*. 2014;84(5):687-699
- Loree HM, Kamm RD, Stringfellow RG, Lee RT. Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. *circ.Res*. 1992;71(4):850-858

- Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness. A systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007;115:459-467
- Luchtefeld M, Grote K, Grothusen C, Bley S, Bandlow N, Selle T, Struber M, Haverich A, Bavendiek U, Drexler H, Schieffer B. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;328:183-188
- Lunder M, Janic M, Habjan S, Sabovic M. Subtherapeutic, low-dose fluvastatin improves functional and morphological arterial wall properties in apparently healthy, middle-aged males- a pilot study. *Atherosclerosis*. 2011;215:446-451

M

- MacNeill BD, Jang IK, Bouma BE, Iftimia N, Takano M, Yabushita H, Shishkov M, Kauffman CR, Houser SL, Aretz T, DeJoseph D, Halpern EF, Tearney GJ. Focal and multi-focal plaque macrophage distribution in patients with acute and stable presentations of coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44(5):972-979
- Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B, Duez H, Fievet C, Staels B, Duverger N, Scherman D, Tedgui A. Protective role of interleukine-10 in atherosclerosis. *Circ Res*. 1999; 85:e17-e24
- Mallat Z, Gojova A, Brun V, Esposito B, Fournier N, Cottrez F, Tedgui A, Groux H. Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. 2003; 108:1232-1237
- Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *British Journal of Pharmacology*. 2000; 130:947-962
- Maron DJ, Fazio S, Linton MRF. Current perspectives on statins. *Circulation*. 2000;101:207-213
- Matz RL, Andriantsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction potential implications for pharmacotherapy. *Drugs aging*. 2003;20(7):527-550
- Michel JB, Virmani R, Arbustini E, Paskerkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *European Heart Journal*. 2011;32:1977-1985
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F. ROS signaling: the new wave? *Trends in plant science*. 2011;16(6):300-309

- Miyazahi *et* Koga. Pravastatin sodium, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, decreases serum total cholesterol in Japanese white rabbits by two different mechanisms. *Atherosclerosis*. 2002;162:299-306
- Monteiro JP, Oliveira PJ, Jurado AS. Mitochondrial membrane lipid remodeling in pathophysiology: A new target for diet and therapeutic interventions. *Progress in lipid research*. 2013;52:513-528
- Mora S, Wenger NK, DeMicco DA, Breazna A, Boekholdt SM, Arsenault BJ, Deedwania P, Kastelein JJP, Waters DD. Determinants of residual risk in secondary prevention patients treated with high- versus low-dose statin therapy. The treating to new target (TNT) study. *Circulation*. 2012;125:1979-1987
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*. 1993; 178:449-460
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417:1-13
- Murray CJL and Lopez D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global burden of disease Study. *Lancet*. 1997;349:1498-1504

N

- Nagai Y, Metter EJ, Earley CJ, Kemper MK, Becker LC, Lakatta EG, Fleg JL. Increased carotid artery intimal-medial thickness in asymptomatic older subjects with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation*. 1998;98:1504-1509
- Nagase H and Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *The journal of biological chemistry*. 1999; 274(31):21491-21494
- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*. 2006; 69:562-573
- Naghavi M *and* Falk E. From vulnerable plaque to vulnerable patient. *Asymptomatic Atherosclerosis: Pathophysiology, Detection and Treatment*. Humana press. 2010 ; 13-38
- Nakai Y, Iwabuchi K, Fujii S, Ishimori N, Dashtsoodol N, Watano K, Mishima T, Iwabuchi C, Tanaka S, Bezbradica JS, Nakayama T, Taniguchi M, Miyake S, Yamamura T, Kitabatake A, Joyce S, Van Kaer L, Onoe K. Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice. *Blood*. 2004; 104:2051-2059
- Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-Deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18:842-851

- Nalbone G, Peiretti F, Canault M, Alessi M-C. Lipides peroxydés et réaction immuno-inflammatoire dans l'athérosclérose. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. 2006 ;13(5):337-342
- Napoli C, de Nigris F, Welch JS, Calara FB, Stuart RO, Glass CK, Palinski W. Maternal hypercholesterolemia during pregnancy promotes early atherogenesis in LDL receptor deficient mice and alters aortic gene expression determined by microarray. *Circulation*. 2002;105:1360-1367
- Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K. Animal models for atherosclerosis, restenosis and endovascular graft research. *JVIR*. 2000;11:5-17
- Naruko T, Ueda M, Haze K, van der Wal AC, van der Loos CM, Itoh A, Komatsu R, Ikura Y, Ogami M, Shimada Y, Ehara S, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002; 106:2894-2900
- Navarro A and Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol*. 2007;292:C670-C686
- Nawroth PP and Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1986; 163:740-745
- NCEP. Report of the national cholesterol education program. Detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *National Institutes of Health*. 2001(3)
- Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest*. 1991; 88:1121-1127
- Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*. 2005; 85:1-31
- Newby AC. Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med*. 2007; 17:253-258
- Newman DL, Gosling RG, Bowden NLR. Changes in aortic distensibility and area ratio with the development of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1971;14:231-240
- Nichols WW and O'Rourke MF. McDonald's blood flow in arteries: theoretical, experimental and clinical principles. 5th edition. London: Hodder Arnold. 2005 p191
- Nichols WW. Clinical measurement of arterial stiffness obtained from noninvasive pressure waveforms. *AJH*. 2005;18:3S-10S
- Nicoletti A, Caligiuri G, Tornberg I, Kodama T, Stemme S, Hansson GK. The macrophage scavenger receptor type A directs modified proteins to antigen presentation. *Eur J Immunol*. 1999; 29:512-521

Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, Crowe T, Howard G, Cooper CJ, Brodie B, Grines CL, DeMaria AN. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis. A randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291(9):1071-1080

Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, Libby P, Raichlen JS, Ballantyne CM, Davignon J, Erbel R, Fruchart JC, Tardif JC, Schoenhagen P, Crowe T, Cain V, Wolski K, Goormastic M, Tuzcu EM. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis. *JAMA*. 2006;295:1556-1565

O

O'Rourke MF and Hashimoto J. Mechanical factors in arterial aging. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(1):1-13

Oh J, Feldman MD, Kim J, Sanghi P, Do D, Mancuso JJ, Kemp N, Cilingiroglu M, Milner T. Detection of macrophages in atherosclerotic tissue using magnetic nanoparticles and differential phase optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.* 2008;13:054006-054006

OMS website Cardiovascular diseases. Fact Sheet n° 317. Update January 2015. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>

Opal SM and DePalo VA. Impact of basic research on tomorrow's medicine. Anti-inflammatory cytokines. *CHEST*. 2000; 117:1162-1172

Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A. Collagen structure and functional implications. *Micron*. 2001; 32: 251-260

P

Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1990; 1044:275-283.

Peters SA, den Ruijter HM, Bots ML. Attenuation of rate of change in carotid intima-media thickness by lipid-modifying drugs: impact on clinical outcomes. *Am J Cardiovasc Drugs* 2011;11:253- 63.

Peters SA, den Ruijter HM, Bots ML, Moons KGM. Improvements in risk stratification for the occurrence of cardiovascular disease by imaging subclinical atherosclerosis: a systematic review. *Heart*. 2012;98:177-184

Pirault J and Lesnik P. Immuno-inflammation dans l'athérosclérose. *OCL*. 2011; 18(1):27-30

Podoleanu AGH. Optical coherence tomography. *Journal of microscopy*. 2012;247(3):209-219

Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, Cohen PA, Frazier WA, Hoff HF, Hazen SL. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for

- LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *Journal of Clinical Investigation*. 2000; 105(8):1095-1108
- Popescu P, Fluerau C, Mao Y, Chang S, Sowa MG. Signal attenuation and box-counting fractal analysis of optical coherence tomography images of arterial tissue. *Biomed Opt Express*. 2010;1:268-277
- Potteaux S, Deleuze V, Merval R, Bureau MF, Esposito B, Scherman D, Tedgui A, Mallat Z. In vivo electrotransfert of interleukin10 cDNA prevents endothelial upregulation of activated NF- κ B and adhesion molecules following an atherogenic diet. *Eur Cytokine Netw*. 2006; 17(1):13-18
- Prati F, Cera M, Ramazzotti V, Imola F, Giudice R, Albertucci M. Safety and feasibility of a new non-occlusive technique for facilitated intracoronary optical coherence tomography (OCT) acquisition in various clinical and anatomical scenarios. *EuroIntervention*. 2007;3(3):365-370
- Prati F, Regar E, Mintz GS, Arbustini E, Di Mario C, Jang IK, Akaaka T, Costa M, Guagliumi G, Grue E, Ozaki Y, Pinto F, Serruys PWJ. Expert review document on methodology, terminology and clinical applications of optical coherence tomography: physical principles, methodology of image acquisition, and clinical application for assessment of coronary arteries and atherosclerosis. *European Heart Journal*. 2010; 31:401-415
- Prendergast C, Quayle J, Burdyga T, Wray S. Atherosclerosis affects calcium signalling in endothelial cells from apolipoprotein E knockout mice before plaque formation. *Cell Calcium*. 2014;55:146-154
- R**
- Raal FJ, Pappu AS, Illingworth DR, Pilcher GJ, Marais AD, Firth JC, Kotze MJ, Heinonen TM, Black DM. Inhibition of cholesterol synthesis by atorvastatin in homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2000;150:421-428
- Ranjith N, Pegoraro RJ, Naidoo DP. Demographic data and outcome of acute coronary syndrome in the South African Asian Indian population. *Cardiovascular journal of South Africa*. 2005;16(1):48-54
- Rezaie- Majd A, Prager GW, Bucek RA, Schernthaner GH, Maca T, Kress HG, Valent P, Binder BR, Minar E, Baghestanian M. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:397- 403
- Riccioni G, Sblendorio V. Atherosclerosis: from biology to pharmacological treatment. *Journal of Geriatric Cardiology*. 2012;9: 305-317

- Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *The new England journal of medicine*. 2001;344(26):1959-1965
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moyer LA, Goldman S, Flaker GC, Braunwald E. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *Circulation*. 1998;98:839-844
- Rizos EC, Agouridis AP, Elisaf SM. The effect of statin therapy on arterial stiffness by measuring pulse wave velocity : a systematic review. *Current Vascular Pharmacology*. 2010; 8(5):638-644
- Rohilla A, Rohilla S, Kumar A, Khan MU, Deep A. Pleiotropic effects of statins: a boulevard to cardioprotection. *Arabian Journal of Chemistry*. 2011
- Rolfe DF et Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews Published*. 1997;77(3) :731-758
- Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *The FASEB journal*. 1993;7(13):1208-1218
- Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*. 1977;86:675-684
- Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*. 1999;340(2):115-126
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature*. 1993;362:801-809
- Rossig L, Hermann C, Haendeler J, Assmus B, Zeiher AM, Dimmeler S. Angiotensin II-induced upregulation of MAP Kinase phosphatase-3 mRNA levels mediates cell apoptosis. *Basic Res Cardiol*. 2002;97:1-8
- Ruffer MA. On arterial lesions found in Egyptian mummies (1580 B.C.-525 A.D.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1911;15:453-466
- S**
- Sadler LS, Gingell R, Martin DJ. Carotid ultrasound examination in Williams syndrome. *The Journal of Pediatrics*. 1998; 132(2):354-356
- Safar M. Paroi artérielle et vieillissement vasculaire. *Editions scientifiques et médicales. Elsevier SAS*. 2002 :77-91
- Safar ME and Boudier HS. Vascular development, pulse pressure and the mechanisms of hypertension. *Hypertension*. 2005;46:205-209
- Sander K, Hof U, Poppert H, Conrad B and Sander D. Improved cerebral vasoreactivity after statin administration in healthy adults. *J Neuroimaging*. 2005;15(3):266-270

- Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF- α and IL-1 β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *The journal of immunology*. 1996; 157:4159-4165
- Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Alba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*. 1997; 386(6):73-77
- Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease : the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *The Lancet*. 1994;344(8934):1383-1389
- Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Olivier MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S, Stern T. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes. The MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2001;285(13):1711-1718
- Scheiber D, Fekete G, Urban Z, Tarjan I, Balaton G, Kosa L, Nagy K, Vajo Z. Echocardiographic findings in patients with Williams-Beuren syndrome. *Wien Klin Wochenschr*. 2006 ;118(17-18) :538-542
- Schoenhagen P, Ziada KM, Vince G, Nissen SE, Tuzcu EM. Arterial remodeling and coronary artery disease: the concept of "dilated" versus "obstructive" coronary atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001; 38(2):297-306
- Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*. 2005;308:1909-1911.
- Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnesen H. Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2002;162:179-185
- Shapiro SD, Campbell EJ, Kobayahi DK, Welgus HG. Immune modulation of metalloproteinase production in human macrophages. Selective pretranscriptional suppression of interstitial collagenase and stromelysin biosynthesis by interferon γ . *J Clin Invest*. 1990; 86:1204-1210
- Shiomi M et Ito T. The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: A tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis*. 2009;207:1-7
- Shiomi M, Ito T, Hirouchi Y, Enomoto M. Fibromuscular cap composition is important for the stability of established atherosclerotic plaques in mature WHHL rabbits treated with statins. *Atherosclerosis*. 2001;157:75- 84

- Shiomi M, Ito T, Tsukada T, Tsujita Y, Horikoshi H. Combination treatment with troglitazone, an insulin action enhancer, and pravastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, shows a synergistic effect on atherosclerosis of WHHL rabbits. *Atherosclerosis*. 1999;142:345-353
- Shiomi M, Ito T, Tsukada T, Yata T, Ueda M. Cell compositions of coronary and aortic atherosclerotic lesions in WHHL rabbits differ. An immunohistochemical study. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:931-937
- Shiomi M, Ito T, Yamada S, Kawashima S, Fan J. Development of an Animal Model for Spontaneous Myocardial Infarction (WHHLMI Rabbit). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1239-1244
- Shiomi M, Koike T, Ito T. Contribution of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia, to elucidation of the anti-atherosclerotic effects of statins. *Atherosclerosis*. 2013;213:39-47
- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 2000;5:415-418
- Sirvent P, Fabre O, Bordenave S, Hilolaire-Buys D, Raynaud De Mauverger E, Lacampagne A, Mercier J. Muscle mitochondrial metabolism and calcium signaling impairment in patients treated with statins. *Toxicology and applied pharmacology*. 2012 ;259 :263-268
- Sluijter JPG, Pulskens WPC, Schoneveld AH, Velema E, Strijder CF, Moll F, de Vries JP, Verheijen J, Hanemaaijer R, de Kleijn DPV, Pasterkamp G. Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions. *Stroke*. 2006; 37:235-239
- Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:8264-8268
- Soehnlein O. Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res*. 2012; 110:875-888
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995;15(9):1512-1531
- Stary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1992;421:277-290
- Steinberg D, Lewis A. Conner Memorial lecture: oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*. 1997;95(4):1062-1071
- Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:3893-3897

Stocker R, Keaney Jr J F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381-1478

Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, Libby P. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation.* 1999; 99:2503-2509

Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Horiuchi S, Takahashi K, Kruijt JK, van Berkel TJC, Steinbrecher UP, Ishibashi S, Maeda N, Gordon S, Kodama T. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature.* 1997; 386:292-296

T

Takarada S, Imanishi T, Kubo T, Tanimoto T, Kitabata H, Nakamura N, Tanaka A, Mizukoshi M, Akasaka T. Effect of statin therapy on coronary fibrous cap thickness in patients with acute coronary syndrome: assessment by optical coherence tomography study. *Atherosclerosis.* 2009;202:491-7

Tang TY, Howarth SP, Miller SR, Graves MJ, Patterson AJ, U-Jing_Im JM, Li ZY, Walsh SR, Brown AP, Kirkpatrick PJ, Warburton EA, Hayes PD, Varty K, Boyle JR, Gaunt ME, Zalewski A, Gillard JH. The ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Study. Evaluation using ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging in carotid disease. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:2039-50

Tanzawa K, Shimada Y, Kuroda M, Tsujita Y, Arai M, Watanabe H. WHHL-rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *FEBS LETTERS.* 1980;118(1):81-84

Tanzawa K, Shimada Y, Kuroda M, Tsujita Y, Arai M, Watanabe H. WHHL-rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *FEBS LETTERS.* 1980;118(1):81-84

Tassabehji M, Metcalfe K, Hurst J, Ashcroft GS, Kielty C, Wilmot C, Donnai D, Read AP, Jones CJP. An elastin gene mutation producing abnormal tropoelastin and abnormal elastic fibres in a patient with autosomal dominant cutis laxa. *Human Molecular Genetics.* 1998;7(6):1021-1028

Taylor KE, Glagov S, Zarins CK. Preservation and structural adaptation of endothelium over experimental foam cell lesions quantitative ultrastructural study. *Atherosclerosis.* 1989;9:881-894

- Taylor-Robinson A and Phillips RS. B cells are required for the switch from Th1- to Th2-regulated immune responses to plasmodium chabaudi chabaudi infection. *Infection and Immunity*. 1994; 62(6):2490-2498
- Tearney GJ, Yabushita H, Houser SL, Aretz HT, Jang IK, Schlendorf KH, Kauffman CR, Shishkov M, Halpern EF, Bouma BE. Quantification of macrophage content in atherosclerotic plaques by optical coherence tomography. *Circulation*. 2003;107:113-119
- Tedgui A and Mallat Z. Athérosclérose et inflammation. *Médecine/sciences*. 2001;17:162-169
- Tedgui A and Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006; 86:515-581
- Tummala P, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes P, Alexander W, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature. A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation*. 1999;100:1223-1229
- Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A. Myocardial infarction and coronary deaths in the world health organization MONICA project. *Circulation*. 1994;90(1):583-612
- Ulicna O, Vancova O, Waczulikova I, Bozek P, Sikurova L, Bada V, Kucharska J. Liver mitochondrial respiratory function and coenzyme Q content in rats on a hypercholesterolemic diet treated with atorvastatin. *Physiol Res*. 2012;61:185-193
- Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszr A. Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *Journal of Gerontology*. 2010;65A(10):1028-1041
- Ungvari Z, Orosz Z, Labinskyy N, Rivera A, Xiangmin Z, Smith K, Csiszar A. Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF-κB activation in aged rat arteries. *Am J Physiol Heart nCirc Physiol*. 2007;293:H37-H47
- V**
- Van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V, Lüscher TF. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med*. 2000;192:1731-1744
- Van Doornum S, McColl G, Wicks IP. Atorvastatin reduces arterial stiffness in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004;63:1571-1575
- Van Gorp AW, van Ingen Schenau DS, Hoeks AP, Struijker Boudier HAJ, Reneman RS, De Mey JGR. Aortic wall properties in normotensive and hypertensive rats of various ages in vivo. *Hypertension*. 1995;26(2):363-368

- Van Popele NM, Grobbee DE, Bots ML, Asmar R, Topouchian J, Reneman RS, Hoeks APG, van der Kuip DAM, Hofman A, Witteman JCM. Association between arterial stiffness and atherosclerosis. The Rotterdam study. *Stroke*. 2001;32:454-460
- Van Soest G, Goderie T, Regar E, Koljenovic S, van Leenders GL, Gonzalo N, van Noorden S, Okamura T, Bouma BE, Tearney GJ, Oosterhuis JW, Serruys PW, van der Steen AF. Atherosclerotic tissue characterization in vivo by optical coherence tomography attenuation imaging. *J Biomed Opt*. 2010;15:011105
- Vassan RS. Biomarkers of cardiovascular disease. Molecular basis and practical considerations. *Circulation*. 2006;113:2335-2362
- Vaughan RA, Garcia-Smith R, Bisoffi M, Conn CA, Trujillo KA. Ubiquinol rescues simvastatin-suppression of mitochondrial content, function and metabolism: implications for statin-induced rhabdomyolysis. *European journal of pharmacology*. 2013;711:1-9
- Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PWM, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DAG, Stewart DJ. A self-fulfilling prophecy C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*. 2002; 106:913-919
- Vilahur G, Padro T, Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: insights from large animal models. *Journal of biomedicine and biotechnology*. 2011; 1-12
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke A P, Farb A, Schwartz S M. Lessons from sudden coronary death. A comprehensive morphological Classification Scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1262-1275
- Vlachopoulos C, Aznaouridis K and Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(13):1318-1327
- Vrhovski B and Weiss AS. Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem*. 1998;258:1-18

W

- Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *TRENDS in molecular medicine*. 2007;14(1):37-44
- Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch J, Griendling KK, Harrison DG, Böhm L, Meinertz T, Münzel T. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 1999;99:2027-2033
- Watanabe Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis*. 1980;36:261-268
- Westerhof N, Lankhaar JW, Westerhof BE. The arterial Windkessel. *Med Biol Eng Comput*. 2009;47:131:141

- Weyman AE and Scherrer-Crosbie M. Marfan syndrome and mitral valve prolapse. *J Clin Invest.* 2004;114(11):1543-1546
- White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA, Tarpey MM. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:1044-1048
- Whitman SC, Rateri DL, Szilvassy SJ, Yokoyama W, Daugherty A. Depletion of natural killer cell function decreases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:1049-1054
- Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998;97:1837-1847
- Witztum JL and Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991;88:1785-1792
- Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *The lancet.* 1994; 344(8925):793-795
- Woods A, Brull DJ, Humphries SE, Montgomery HE. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukine-6. *European Heart Journal.* 2000;21:1574-1583

X

- Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Arditi M. Tool-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation.* 2001; 104:3103-3108
- Xu XP, Meisel SR, Ong JM, Kaul S, Cercek B, Rajavashisth TB, Sharifi B, Shah PK. Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase 9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation.* 1999;99:993-998

Y

- Yabushita H, Bouma BE, Houser SL, Aretz HT, Jang IK, Schlendorf KH, Kauffman CR, Shishkov M, Kang DH, Halpern EF, Tearney GJ. Characterization of human atherosclerosis by optical coherence tomography. *Circulation.* 2002;106:1640-1645
- Yamada S, Ito T, Tamura T, Shiomi M. Age-related changes in serum/plasma biochemical parameters of WHHLMI rabbits. *Exp. Anim.* 2004;53(2):159-163
- Yamashina A, Tomiyama H, Takeda K, Tsuda H, Arai T, Hirose K, Koji Y, Hori S, Yamamoto Y. Validity, reproductibility and clinical significance of noninvasive brachial-ankle pulse wave velocity measurement. *Hypertens Res.* 2002; 25:359-364

Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Laboratory Animals*. 2004;38:246-256

Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88:5252-5256

Yu CM, Zhang Q, Lam L, Lin H, Kong SL, Chan W, Fung JWH, Cheng KKK, Chan HIS, Lee SWL, Sanderson JE, Lam CWK. Comparison of intensive and low-dose atorvastatin therapy in the reduction of carotid intimal-medial thickness in patients with coronary heart disease. *Heart*. 2007;93:933-939

Z

Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension*. 2001;38:1395-1399

Zaragoza C, Gomez_Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, Tarin C, Mas S, Ortiz A, Egido J. Animal models of cardiovascular diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011:1-13

Zemankova L, Varejckova M, Dolezalova E, Fikrova P, Jezkova K, Rathouska J, Cerveny L, Botella LM, Bernabeu C, Nemeckova I and Nachtigal P. Atorvastatin-induced endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells is mediated by endoglin. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(3):403-413

Zhang G, Li M, Li L, Xu Y, Li P, Yang C, Zhou Y, Zhang J. The immunologic injury composite with balloon injury leads to dyslipidemia: a robust rabbit model of human atherosclerosis and vulnerable plaque. *Journal of biomedicine and biotechnology*. 2012: 1-11

Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, Hansson GK. Transfert of CD4+ T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation*. 2000; 102:2919-2922

Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:932-943

Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages. Implications for atherosclerosis. *Circulation*. 2001; 103:1194-1197

VALORISATION SCIENTIFIQUE

PUBLICATION

TISSIER F, DUSSAUZE M, LEFLOCH N, THERON M, LEMAIRE P, LE FLOCH S, PICHAVANT-RAFINI K, 2015. « Effects of dispersed crude oil on cardiac function in seabass *Dicentrarchus labrax*. Chemosphere 134:192-198

COMMUNICATIONS AVEC ACTE

1. **TISSIER F.**, DIDIER R., LAUTRIDOU J., BOSCHAT J., DESFONTIS J-C., MALLEM Y., MANSOURATI J., PICHAVANT-RAFINI K., THERON M., GILARD M., 2015. « Effects of an early and low-dose hypolipidemic treatment of atherosclerosis : an OCT study in Watanabe rabbits ». **Acte:** Atherosclerosis, 241:e204, DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.977
Congrès: 83^{ème} congrès de l'EAS (European Atherosclerosis Society), Glasgow 22/03/2015 - 25/03/2015. Communication affichée.
2. **TISSIER F.**, FARHAT F., DIDIER R., GILARD M., MALLEM Y., MANSOURATI J., PHILOUZE C., PICHAVANT-RAFINI K., THERON M., AMERAND A., 2015. « Long-term atorvastatin treatment decreases mitochondrial vulnerability to reactive oxygen species in a model of hereditary hypercholesterolemia (Watanabe rabbits) ». **Acte:** Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 38(supplement1):110
Congrès: 13^{ème} congrès international de l'EAVPT (European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology), Nantes, 19/07/2015 - 22/07/2015. Communication affichée.
3. DIDIER R., **TISSIER F.**, DESFONTIS J-C, MALLEM Y., BEN Salem D., MANSOURATI J., MOISAN C., PICHAVANT K., THERON M., GILARD M., 2014. « Validation of intravascular optical coherence tomography by analyzing *in vivo* vulnerable plaques in atherosclerotic Watanabe rabbits during one year: correlation with histological findings ». **Acte:** European Heart Journal, 35 (abstract supplement 1):704-705. DOI 10.1093/eurheartj/ehu324.
Congrès: Congrès de l'ESC (European Society of Cardiology), Barcelone, 30/08/2014 - 3/09/2014 . Poster commenté.
4. FARHAT F., **TISSIER F.**, DIDIER R., GILARD M., MALLEM Y., MANSOURATI J., PHILOUZE C., PICHAVANT-RAFINI K., THERON M., AMERAND A., 2015. «Cardiac mitochondria vulnerability to reactive oxygen species: long term effects of statins in a model of hereditary hypercholesterolemia (Watanabe Rabbits) ». **Acte:** Archives of Cardiovascular Diseases Supplements, 7(2):133
Congrès: Printemps de la cardiologie (Société Française de Cardiologie), Toulouse, 02/04-03/04 . Communication affichée.

COMMUNICATION SANS ACTE

TISSIER F., MALLEM Y., GOANVEC C., DESFONTIS J-C., BOURGEOIS N., THERON M., ROQUEFORT P., AUBRY T., PICHAVANT-RAFINI K., MANSOURATI J., GILARD M., 2015. « Non-hypocholesterolemic atorvastatin treatment prevents mechanical and functional vascular impairments in WHHL. »

Congrès: Society of Experimental Biology congress, Prague, 30/06/2015 - 03/07/2015
communication affichée.

VULGARISATION SCIENTIFIQUE

1. **TISSIER F.**, DIDIER R., PICHAVANT K., THERON M., DESFONTIS J-C, MALLEM Y., LENNE C., GILARD M., 2013. «Primary prevention and atherosclerosis: development of tools for early detection of high-risk plaques and testing of preventive medication». Journée des Doctorants en Biologie et santé de Bretagne. Communication affichée, Brest, 21 juin 2013.
2. **TISSIER F.**, DIDIER R., PICHAVANT K., THERON M., AUBRY T., ROQUEFORT P., PLEE-GAUTIER E., DESFONTIS J-C., MALLEM Y., GILARD M., 2013. «Primary prevention and atherosclerosis: development of tools for early detection of high-risk plaques and testing of preventive medication». Journée des doctorants de l'ED SICMA. Communication affichée, Brest, 26 septembre 2013.
3. **TISSIER F.**, « Mise en évidence de l'effet d'un traitement hypolipidémiant sur l'évolution des plaques d'athérome : Analyse en Tomographie par Cohérence Optique (OCT) »
Communication orale. Journée des doctorants de l'ED SICMA, Brest, 25 septembre 2014.
4. **TISSIER F.**, MALLEM Y, GOANVEC C, DESFONTIS J-C, BOURGEOIS N, THERON M, ROQUEFORT P, AUBRY T, PICHAVANT-RAFINI K, MANSOURATI J, GILARD M, 2015. « Non-hypocholesterolemic atorvastatin treatment prevents mechanical and functional vascular impairments in WHHL. » Colloque annuel de l'IBSAM. Communication orale Brest, 11 juin 2015.
5. **TISSIER F.**, MALLEM Y, GOANVEC C, DESFONTIS J-C, BOURGEOIS N, THERON M, ROQUEFORT P, AUBRY T, PICHAVANT-RAFINI K, MANSOURATI J, GILARD M, 2015. « Non-hypocholesterolemic atorvastatin treatment prevents mechanical and functional vascular impairments in WHHL. » Colloque annuel de l'IBSAM. Communication affichée Brest, 11 juin 2015.