



HAL
open science

Evaluation préclinique et clinique de cAbVCAM1-5, nouveau radiotracteur des plaques d'athérome

Laurent Dumas

► **To cite this version:**

Laurent Dumas. Evaluation préclinique et clinique de cAbVCAM1-5, nouveau radiotracteur des plaques d'athérome. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAS024 . tel-02384990

HAL Id: tel-02384990

<https://theses.hal.science/tel-02384990v1>

Submitted on 28 Nov 2019

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

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



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : BIS - Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Laurent DUMAS

Thèse dirigée par **Daniel FAGRET**, Communauté Université Grenoble Alpes
et codirigée par **Alexis BROISAT**, Communauté Université Grenoble Alpes

préparée au sein du **Laboratoire Radiopharmaceutiques biocliniques**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la santé la Cognition et l'Environnement**

Evaluation préclinique et clinique de cAbVCAM1-5, nouveau radiotraceur des plaques d'athérome

Preclinical and clinical evaluation of cAbVCAM1-5, a new radiotracer of atherosclerotic lesions

Thèse soutenue publiquement le **17 septembre 2018**,
devant le jury composé de :

Monsieur ALEXIS BROISAT

CHARGE DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION ALPES, Co-directeur de thèse

Madame SYLVIE CHALON

DIRECTRICE DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION GRAND-OUEST, Examineur

Monsieur GERALD VANZETTO

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., CHU GRENOBLE ALPES, Examineur

Madame CATHERINE GHEZZI

PROFESSEUR, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES, Président

Monsieur ALAIN-PIERRE GADEAU

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM BORDEAUX, Rapporteur

Monsieur OLIVIER MUNDLER

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., CHU DE LA TIMONE - MARSEILLE, Rapporteur

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal et imagerie
pour la médecine, la biologie et l'environnement**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Laurent DUMAS

Thèse dirigée par **Daniel FAGRET, PU-PH, CHUGA**, et
Co-dirigée par **Alexis BROISAT, CR INSERM**

Préparée au sein du **Laboratoire Radiopharmaceutiques
Biocliniques UMR INSERM 1039**

Dans l'**École Doctorale ingénierie pour la santé, la cognition et
l'environnement**

Evaluation préclinique et clinique de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5, nouveau radiotraceur des plaques d'athérome

Thèse soutenue publiquement le **17 septembre 2018**,
Devant le jury composé de :

Mr Olivier MUNDLER

PU-PH, Marseille, Rapporteur

Mr Alain-Pierre GADEAU

DR, Bordeaux, Rapporteur

Mme Sylvie CHALON

DR, Tours, Examinatrice

Mr Maurizio F. MARIANI

DR Advanced Accelerator Applications SA, Invité

Mme Catherine GHEZZI

PU, Grenoble, Examinatrice

Mr Alexis BROISAT

CR, Grenoble, Directeur de thèse

Mr Gerald VANZETTO

PU-PH, Grenoble, Examineur



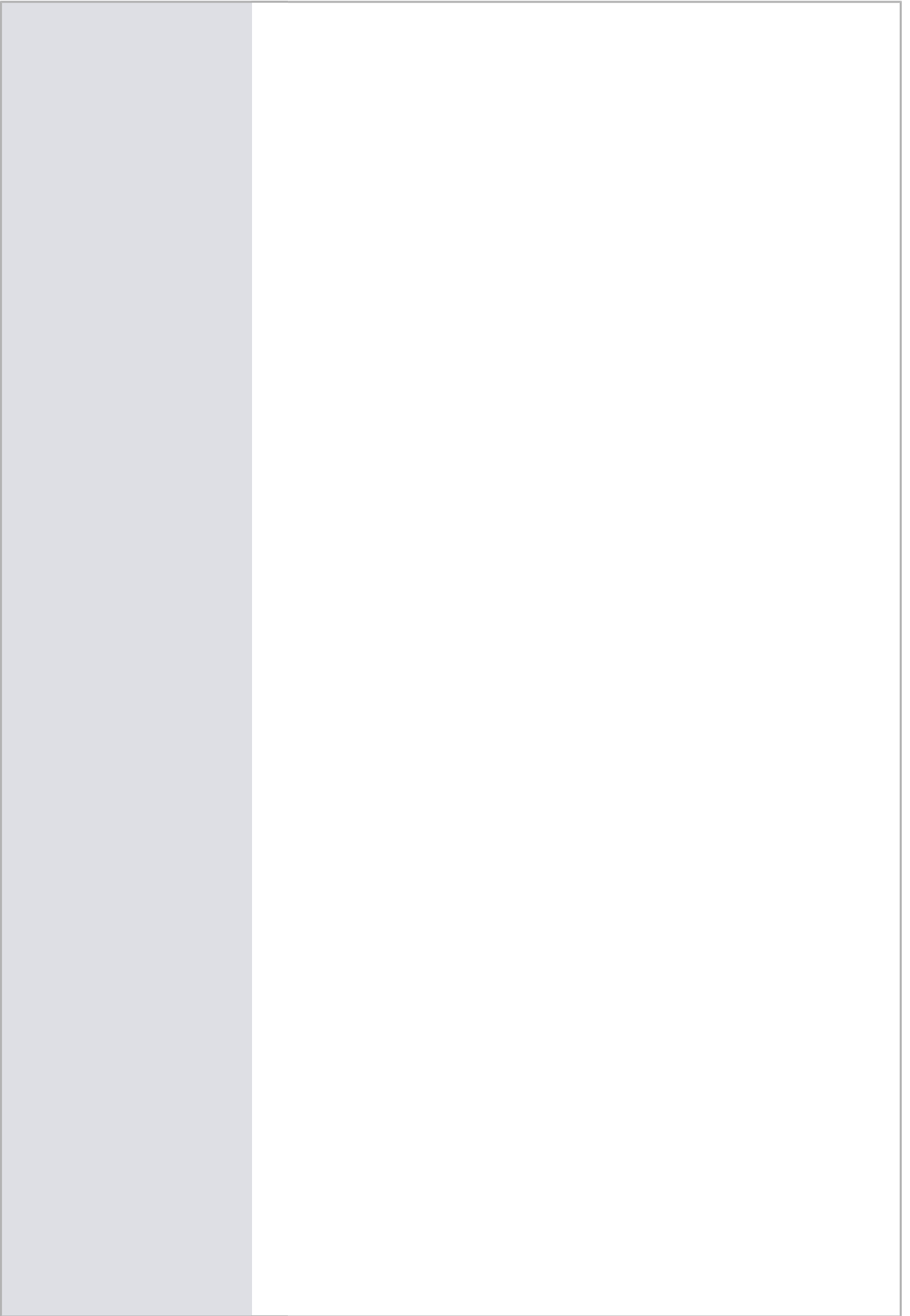


TABLE DES MATIERES

Abréviations	12
Revue bibliographique	15
I Les maladies cardiovasculaires (MCV) :.....	15
I.A Epidémiologie.....	15
I.B Les cardiopathies ischémiques.....	16
I.C L'Accident vasculaire cérébrale (AVC).....	19
I.D Artériopathie obstructive des membres inférieurs (AOMI)	20
I.E Facteurs de risque	21
I.E.1 Facteurs de risque non modifiables	21
I.E.1.1 Âge.....	21
I.E.1.2 Sexe	22
I.E.1.3 Antécédents familiaux.....	22
I.E.2 Facteurs de risque modifiables	22
I.E.2.1 Hypercholestérolémie	23
I.E.2.2 Le diabète	23
I.E.2.3 Le tabagisme.....	25
I.E.2.4 Hypertension artérielle.....	26
I.E.2.5 L'obésité	27
I.E.2.6 Inactivité physique	28
I.E.2.7 Consommation d'alcool.....	29
I.E.2.8 Pollution de l'air	30
I.E.2.9 Le stress chronique.....	31
I.E.2.10 Les agents infectieux	31
I.E.3 Evaluation du risque cardiovasculaire en prévention primaire :	33
II Physiopathologie de l'athérosclérose	36
II.A Structure des parois vasculaires.....	36
II.A.1 La tunique interne (intima)	37
II.A.2 La tunique moyenne (média)	37
II.A.3 Tunique externe (adventice)	38
II.B Classification des lésions	38
II.C Initiation de l'athérosclérose.....	41
II.C.1 La dysfonction endothéliale	41
II.C.2 Les lipoprotéines	43
II.C.2.1 Rôle des apolipoprotéines dans l'athérosclérose	43

II.C.2.1.1	Apolipoprotéines B (ApoB).....	43
II.C.2.1.2	Apolipoprotéines E.....	44
II.C.2.2	Pénétration des LDL.....	45
II.C.2.3	La rétention	45
II.C.2.4	Oxydation	45
II.C.3	La réponse inflammatoire	46
II.C.3.1	Recrutement des leucocytes	47
II.C.3.1.1	Capture et roulement.....	47
II.C.3.1.2	Adhésion ferme	47
II.C.3.1.2.1	Les molécules d'adhésion à domaine ig-CAM.....	48
II.C.3.1.2.1.a	VCAM-1	48
II.C.3.1.2.1.b	ICAM-1.....	49
II.C.3.1.2.1.c	PECAM-1.....	49
II.C.3.1.3	Transmigration endothéliale.....	49
II.C.3.2	Réponse immunitaire innée	49
II.C.3.2.1	Les récepteurs PRR.....	50
II.C.3.2.1.1	L'inflammasome	50
II.C.3.2.1.2	Récepteurs de type "Toll-like" (TLR).....	51
II.C.3.2.1.3	Les "Scavenger Receptors" (SR).....	52
II.C.3.2.2	Les cytokines	53
II.C.3.2.2.1	Les cytokines pro-inflammatoires.....	53
II.C.3.2.2.1.a	Les interleukines.....	53
II.C.3.2.2.1.a.i	IL-1 α et β	54
II.C.3.2.2.1.a.ii	IL-18.....	55
II.C.3.2.2.1.a.iii	IL-6	55
II.C.3.2.2.1.a.iv	IL-17	55
II.C.3.2.2.1.b	L'interféron gamma.....	56
II.C.3.2.2.1.c	Le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)	56
II.C.3.2.2.1.d	Les Colony Stimulating Factor (CSF).....	56
II.C.3.2.2.1.d.i	Granulocyte/Monocyte-CSF (GM-CSF).....	56
II.C.3.2.2.1.d.ii	Monocyte-CSF (M-CSF).....	57
II.C.3.2.2.2	Les cytokines anti-inflammatoires	57
II.C.3.2.2.2.a	IL-10.....	57
II.C.3.2.2.2.b	Famille de l'IL-1	57
II.C.3.2.2.2.c	Transformation Growth Factor - β (TGF- β).....	57
II.C.3.2.2.2.d	IL-35.....	58

II.C.3.2.2.3	Les chimiokines et leurs récepteurs	58
II.C.3.2.3	Les cellules de l'immunité innée	59
II.C.3.2.3.1	Monocytes/Macrophages	59
II.C.3.2.3.2	Les polynucléaires neutrophiles (PNN)	63
II.C.3.2.3.3	Les "natural killers" (NK)	64
II.C.3.2.3.4	Les mastocytes	64
II.C.3.2.3.5	Les cellules dendritiques (CDs).....	65
II.C.3.3	Réponse immunitaire adaptative	66
II.C.3.3.1	Les lymphocytes T	66
II.C.3.3.1.1	Les Th2.....	66
II.C.3.3.1.2	Les Th17.....	67
II.C.3.3.1.3	Les NKT	67
II.C.3.3.1.4	Les LTreg.....	67
II.C.3.3.2	Les lymphocytes B	68
II.C.3.4	Les micro-ARN (miARN).....	69
II.D	Progression de l'athérosclérose	71
II.D.1	Rôle des cellules musculaires lisses (CMLs).....	71
II.D.1.1	Origine embryonnaire des CMLs	71
II.D.1.2	Modifications phénotypiques des CMLs	72
II.D.1.3	La sénescence des CMLs.....	73
II.D.2	Rôle de l'apoptose	74
II.D.3	Le remodelage des lésions	75
II.D.3.1	Le remodelage positif.....	75
II.D.3.2	Les métalloprotéases (MMP)	75
II.D.3.3	La néoangiogenèse	75
II.D.3.4	Calcification	76
II.D.4	Résolution de l'inflammation	76
II.E	Les plaques vulnérables.....	78
II.E.1	Notion de vulnérabilité.....	79
II.E.2	Les plaques vulnérables.....	79
II.E.2.1	La rupture de plaque de type TCFA.....	79
II.E.2.2	L'érosion de plaque	81
II.E.2.3	Les nodules calciques	83
II.E.3	L'athérombose.....	84
II.E.3.1	L'hémostase.....	84
II.E.3.1.1	Hémostase primaire	84

II.E.3.1.1.1	Agrégation plaquettaire	84
II.E.3.1.1.2	Adhésion des plaquettes	85
II.E.3.1.1.3	Activation et recrutement	85
II.E.3.1.1.4	Agrégation	87
II.E.3.1.2	Hémostase secondaire (coagulation)	88
II.E.3.2	La fibrinolyse.....	88
II.E.3.3	Les plaquettes.....	88
II.E.3.3.1	Rôle dans l'inflammation.....	88
II.E.3.3.2	Rôle dans l'athérosclérose	89
II.E.3.4	Evolution du thrombus.....	90
III	Thérapies.....	92
III.A	Les lipoprotéines	92
III.A.1	Réduction du taux de LDL-C	92
III.A.1.1	Statines	94
III.A.1.2	Ezétimibe	95
III.A.1.3	PCSK-9 (Protein convertase subtilisin/kexin 9)	97
III.A.1.4	ANGPTL3 (angiopoietin-like 3)	100
III.A.2	HDL	101
III.A.2.1	Niacines (acide nicotinique)	102
III.A.2.2	Les Fibrates.....	102
III.A.2.3	Mimétiques des HDL	103
III.A.2.4	Inhibiteurs de la CETP.....	104
III.B	Inflammation	104
III.B.1	Etude CANTOS	106
III.B.2	Les thérapies non spécifiques	107
III.B.2.1	Aspirine.....	107
III.B.2.2	Colchicine	108
III.B.2.3	Méthotrexate	109
III.B.3	Les thérapies ciblées.....	110
III.B.3.1	Inhibiteurs des cytokines pro-inflammatoires	110
III.B.3.2	Cytokines anti-inflammatoires	110
III.B.3.3	Les inhibiteurs des "checkpoints" de l'immunité.....	111
III.B.3.4	Résolution de l'inflammation	112
III.B.4	Anti-agrégants plaquettaires et anti-coagulants.....	113
III.B.4.1	Les anti-agrégants plaquettaires.....	113
III.B.4.2	Anti-coagulants.....	116

IV	Imagerie de la plaque vulnérable.....	119
IV.A	Imagerie intravasculaire coronarienne	120
IV.A.1	Coronarographie (ICA).....	120
IV.A.2	IVUS	121
IV.A.3	Tomographie par cohérence optique (OCT).....	123
IV.A.4	NIRF	125
IV.A.5	NIRS ("near-infrared spectroscopy").....	126
IV.B	Imagerie non invasive.....	127
IV.B.1	Morphologique.....	127
IV.B.1.1	Coronarographie par tomodensitométrie (CCTA).....	128
IV.B.1.2	Imagerie échographique.....	131
IV.B.1.3	L'imagerie par résonance magnétique (IRM).....	133
IV.B.2	Imagerie moléculaire.....	134
IV.B.2.1	Traceurs des processus inflammatoires dans l'athérosclérose.....	135
IV.B.2.1.1	Les macrophages.....	136
IV.B.2.1.1.1	¹⁸ F-FDG	136
IV.B.2.1.1.2	⁶⁸ Ga-DOTATATE.....	138
IV.B.2.1.1.3	¹¹ C-PK11195	140
IV.B.2.1.1.4	¹⁸ F-FCH	140
IV.B.2.1.2	Hypoxie	141
IV.B.2.1.2.1	¹⁸ F-fluoromisonidazole (¹⁸ F-FMISO).....	142
IV.B.2.1.2.2	¹⁸ F-HX4	143
IV.B.2.1.3	Récepteur aux chimiokines.....	143
IV.B.2.1.3.1	⁶⁸ Ga-Pentixafor	143
IV.B.2.1.4	Apoptose.....	144
IV.B.2.1.4.1	Annexine V	144
IV.B.2.1.5	Angiogenèse.....	144
IV.B.2.1.5.1	Ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	145
IV.B.2.1.6	Micro-calcifications.....	145
IV.B.2.1.6.1	¹⁸ F-sodium fluoride (¹⁸ F-NaF).....	145
V	Travaux antérieurs.....	148
V.A	Choix de la cible : VCAM-1.....	148
V.A.1	Expression de VCAM-1	148
V.A.2	L'intégrine $\alpha_4\beta_1$, ligand de VCAM-1.....	150
V.B	Nature du radiotraceur : les nanobodies	151
V.C	Production et sélection de nanobodies anti VCAM-1	153

V.C.1	Génération des nanobodies	153
V.C.2	Caractérisation in vitro	154
V.C.3	Radiomarquage	155
V.C.4	Evaluation in vivo.....	155
V.C.5	Sélection du meilleur candidat : cAbVCAM1-5	156
VI	Transfert clinique	157
VI.A.1	Le médicament radiopharmaceutique (MRP)	157
VI.A.2	Aspect règlementaire du MRP.....	158
VI.A.3	Développement d'un MRP	159
VI.A.3.1	Phase de recherche :	159
VI.A.3.1.1	La recherche préclinique :	159
VI.A.3.1.1.1	Etude pharmacocinétique	159
VI.A.3.1.1.2	Evaluation de l'innocuité au stade préclinique :	160
VI.A.3.1.1.2.a	Spécificité pour les médicaments expérimentaux administrés en micro-dose	161
VI.A.3.2	Dossier du médicament expérimental (DME)	162
VI.A.3.3	Les essais cliniques	163
	Partie expérimentale	167
I	Introduction.....	167
II	Partie I : Caractérisation préclinique de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5	168
II.A	Evaluation de la sensibilité de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5 pour l'imagerie de l'inflammation des plaques d'athérome chez la souris ApoE ^{-/-}	168
II.A.1	Objectif	168
II.A.2	Matériels et méthodes	168
II.A.2.1	Modèle animal.....	168
II.A.2.2	Radiomarquage de cAbVCAM1-5 au ^{99m} Tc.....	170
II.A.2.3	Comparaison entre la fixation de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5 et le niveau d'expression de VCAM-1	170
II.A.2.3.1	Autoradiographie	170
II.A.2.3.2	Immunohistochimie	171
II.A.2.4	Evaluation non invasive de la sensibilité de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5	171
II.A.2.4.1	Imagerie SPECT/CT	172
II.A.2.4.1.1	Analyse d'images.....	172
II.A.2.4.2	Analyses ex vivo	173
II.A.2.4.2.1	Biodistribution	173
II.A.2.4.2.2	Autoradiographie (ARG).....	173

II.A.2.5	Analyses statistiques	174
II.A.3	Résultats	175
II.A.3.1	Fixation de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5 vs l'expression de VCAM-1.....	175
II.A.3.2	Evaluation non invasive d'un traitement antiathérogène de référence, l'atorvastatine.	176
II.A.3.2.1	Quantification <i>in vivo</i> : Imagerie SPECT/CT.	176
II.A.3.2.2	Quantification <i>ex vivo</i>	177
II.A.3.2.2.1	Biodistribution par prélèvements d'organes	177
II.A.3.2.2.2	Autoradiographie	178
II.A.3.3	Comparaison entre les quantifications <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	179
II.A.4	Discussion	179
II.B	Evaluation de la sensibilité de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5 chez un modèle de souris ApoE ^{-/-} sous régime Paigen traitées à l'ézétimibe.	182
II.B.1	Objectif	182
II.B.2	Matériel et méthodes.....	182
II.B.2.1	Animaux et régime	182
II.B.2.2	Dosage du cholestérol plasmatique	183
II.B.2.3	Effet de l'ézétimibe sur les lésions athéromateuses et l'inflammation	184
II.B.2.3.1	Radiomarquage au technétium ^{99m} de cAbVCAM1-5.....	184
II.B.2.3.2	Imagerie SPECT/CT	184
II.B.2.3.3	Analyse <i>ex vivo</i>	184
II.B.2.3.3.1	Evaluation de l'expression de VCAM-1 déterminée par ELISA	184
II.B.2.3.3.2	Western blot	185
II.B.2.4	Analyses statistiques	186
II.B.3	Résultats	186
II.B.3.1	Effet de l'ézétimibe sur le cholestérol plasmatique et la masse corporelle.	186
II.B.3.2	Effet de l'ézétimibe sur l'athérosclérose.....	188
II.B.3.2.1	Imagerie <i>in vivo</i> SPECT/CT.....	188
II.B.3.2.2	Analyses <i>ex vivo</i>	189
II.B.3.3	Comparaison entre les méthodes de quantification <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	190
II.B.3.4	Expression de VCAM-1 vs fixation de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5	190
II.B.3.5	Effets anti-inflammatoires de l'ézétimibe	192
II.B.4	Discussion	193
II.C	Evaluation des effets antiathérogènes des antagonistes au récepteur P2Y ₁₂ chez un modèle de souris ApoE ^{-/-} sous régime Paigen.	197
II.C.1	Objectif	197
II.C.2	Matériel et méthodes.....	199

II.C.2.1	Modèle animal.....	199
II.C.2.2	Validation de la posologie par agrégométrie	200
II.C.2.3	Radiomarquage de cAbVCAM1-5 au technétium 99m.	201
II.C.2.4	Imagerie SPECT/CT	201
II.C.2.4.1	Analyse In vivo.....	202
II.C.2.5	Analyses <i>ex vivo</i>	202
II.C.2.5.1	Biodistribution par prélèvements d'organes	202
II.C.2.5.2	Autoradiographie.	203
II.C.2.6	Analyses statistiques	203
II.C.3	Résultats :	204
II.C.3.1	Validation de la posologie	204
II.C.3.2	Effets du Ticagrelor et du Prasugrel	204
II.C.3.2.1	Masse corporelle et taux de cholestérol.....	204
II.C.3.2.2	Caractérisation des lésions athéromateuses	205
II.C.3.2.3	Quantification in vivo de la fixation de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5 au sein de l'aorte ascendante.	205
II.C.3.2.4	Quantification ex vivo de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5.....	206
II.C.3.2.4.1	Biodistribution par prélèvements d'organes.	206
II.C.3.2.4.2	Autoradiographie	207
II.C.4	Discussion	207
II.D	Evaluation de la biodistribution de cAbVCAM1-5 couplé à un fluorochrome	211
II.D.1	Objectif.....	211
II.D.2	Matériels et méthodes	212
II.D.2.1	Modèle animal.....	212
II.D.2.2	Imagerie par fluorescence de cAbVCAM1-5 (Fluobeam 800)	212
II.D.2.3	Analyse des images.....	212
II.D.2.4	Analyses statistiques	213
II.D.3	Résultats	213
II.D.4	Discussion	215
II.E	Evaluation de l'effet de cAbVCAM1-5 sur l'interaction entre VLA-4 et VCAM-1	216
II.E.1	Objectif.....	216
II.E.2	Matériels et méthodes	217
II.E.2.1	Culture cellulaire	217
II.E.2.2	Radiomarquage au ^{99m} Tc des cellules Jurkat :	217
II.E.2.3	Test d'adhésion cellulaire (cellules à cellules).....	218
II.E.2.4	Analyse des résultats.....	218

II.E.2.5	Analyses statistiques	219
II.E.3	Résultats :	219
II.F	Conclusion Partie I.....	221
III	Partie II : Transfert clinique	223
III.A	Objectif	223
III.B	Matériels et méthodes :	223
III.B.1	Optimisation du radiomarquage de cAbVCAM1-5 au ^{99m} Tc et de l'intermédiaire de réaction tricarbonyl produit aux normes BPF	223
III.B.1.1	Description de la méthode initiale de radiomarquage	223
III.B.1.2	Paramètres évalués	224
III.B.1.2.1	Température	224
III.B.1.2.2	Masse	225
III.B.1.2.3	Méthode "1 étape"	225
III.B.1.2.4	Utilisation du NaCl comme tampon d'élution.....	225
III.B.1.3	Intermédiaire de réaction tricarbonyl produit aux normes BPF par ERAS labo	226
III.B.2	Optimisation de la dosimétrie	227
III.B.3	Validation des Lot BPF de cAbVCAM1-5.....	227
III.B.3.1	Optimisation du rendement de production	228
III.B.3.2	Développement du <i>processus</i> de production et d'analyse	228
III.B.3.3	Synthèse et reformulation du lot BPF	229
III.B.4	Méthodes d'évaluation	230
III.B.4.1	Non radiomarqué (SPR).....	230
III.B.4.2	Radiomarqué	231
III.B.4.2.1	Pureté radiochimique (PRC) et stabilité.....	231
III.B.4.2.2	Analyse in vitro de l'affinité de cAbVCAM1-5 radiomarqué au ^{99m} Tc	232
III.B.4.2.3	Evaluation in vivo et ex vivo de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5	232
III.B.4.2.3.1	Modèle animal :	232
III.B.4.2.3.1.a	Optimisation du radiomarquage et évaluation des lots et de l'intermédiaire tricarbonyl produits aux BPF	232
III.B.4.2.3.1.b	Optimisation de la dosimétrie.....	233
III.B.4.2.3.2	Imagerie SPECT/CT	233
III.B.4.2.3.2.a	Optimisation du radiomarquage et évaluation des lots BPF	233
III.B.4.2.3.2.b	Optimisation de la dosimétrie.....	234
III.B.4.2.3.3	Biodistribution.....	234
III.B.1	Analyses statistiques	235
III.C	Résultats	237

III.C.1	Optimisation du radiomarquage de cAbVCAM1-5 au technétium ^{99m} et évaluation de l'intermédiaire de réaction tricarbonyle produit aux normes BPF	237
III.C.1.1	Pureté radiochimique (PRC) des différentes méthodes de radiomarquage	237
III.C.1.2	Analyse par saturation de liaison de l'affinité de cAbVCAM1-5 radiomarké au ^{99m} Tc suivant les différentes méthodes d'optimisation du radiomarquage.....	238
III.C.1.3	Biodistribution par prélèvements d'organes.....	239
III.C.1.3.1	Evaluation de la biodistribution de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5 chez des souris saines (souris C57BL/6J)	239
III.C.1.3.2	Evaluation de la biodistribution de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5 au sein des lésions athéromateuses (souris ApoE ^{-/-}).....	240
III.C.2	Optimisation de la dosimétrie	242
III.C.2.1	Pureté radiochimique du radiomarquage de cAbVCAM1-5(3HIS) au ^{99m} Tc.....	242
III.C.2.2	Biodistribution par prélèvements d'organes.....	242
III.C.2.2.1	Tag HIS.....	242
III.C.2.2.2	Gélofusine	243
III.C.3	Evaluation des lots produits par PxTherapeutics.	245
III.C.3.1	Evaluation des lots produits par PxTherapeutics non radiomarké (par SPR) ...	245
III.C.3.2	Evaluation des nanobodies radiomarkés au ^{99m} Tc.....	246
III.C.3.2.1	Pureté radiochimique.....	246
III.C.3.2.2	Analyse In vitro de l'affinité des différents lots de cAbVCAM1-5 produits par PxTherapeutics et radiomarkés au ^{99m} Tc	246
III.C.3.2.3	Etude ex vivo par prélèvements d'organes des différents lots PX.....	247
III.C.3.3	Reformulation du lot clinique (étude de stabilité)	248
III.C.3.3.1	PRC	248
III.C.3.3.2	Analyse In vitro de l'affinité du lot Px-6 radiomarké au ^{99m} Tc après reformulation au polysorbate 20 à 0,05% ou au polysorbate 80 à 0,01%.	249
III.C.3.3.3	Biodistribution par prélèvements d'organes	249
III.C.4	Validation des paramètres sélectionnés pour le transfert en clinique	251
III.D	Discussion et conclusion partie II	253
	Conclusion générale	257
	Références bibliographiques	259

ABREVIATIONS

Apo : apolipoprotéine

ApoE^{-/-} : déficience pour le gène de l'apolipoprotéine E

AVC : accident vasculaire cérébrale

BPL : bonnes pratiques de laboratoires

BPF : bonnes pratiques de fabrication

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

CD : cellules dendritiques

CE : cellules endothéliales

CML : cellules musculaires lisses

CRP : C-reactive protein

CSHP : cellules souches hématopoïétiques

CT : computed tomography (tomodensitométrie)

DAMPs : damaged associated molecular patterns

EMA : European medicines agency (agence européenne des médicaments)

HDL : high density lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)

HMG-CoA : hydroxymethylglutaryl-coenzyme A

HSP : heat shock protein (protéine de choc thermique)

HU : hounsfield unit

IL : interleukines

IMA : infarctus du myocarde aigu

IRM : imagerie par résonance magnétique

LB : lymphocytes B

LDL-C : low density lipoprotein-cholesterol (lipoprotéines de basse densité)

LT : lymphocytes T

MCV : maladies cardiovasculaires

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1, aussi appelé CCL2

MEC : matrice extra-cellulaire

MMP : métalloprotéases

MRP : médicament radiopharmaceutique

NET : neutrophils extracellular trap (piège extracellulaire des neutrophiles)

NLRP3 : nucleotide oligomerization domain-like-receptor protein 3

NSTEMI : non ST elevation myocardial infarctus (infarctus du myocarde sans sus-décalage du segment ST)

OCT : optical coherence tomography (tomographie par cohérence optique)

PAMPs : pathogen associated molecular patterns (motifs moléculaires associés aux pathogènes)

PAS : pression artérielle systolique

PAR : protease activator receptor (récepteur activé par les protéases)

PCSK9 : protein convertase substilisine/kexine 9

PNN : polynucléaires neutrophiles

PET : positon emission tomography (ou TEP : Tomographie par émission de positrons)

PRC : pureté radiochimique

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

RP-UPLC : reverse phase-ultra performance liquid chromatography

RP-HPLC : reverse phase-high performance liquid chromatography

SCA : syndrome coronarien aigu

SE-HPLC : size-exclusion-high performance liquid chromatography

SPECT : single photon emission computed tomography (ou TEMP: Tomographie par émission monophotonique)

SPM : specialized pro-resolving mediators

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

SR : scavenger receptor (récepteur éboueur)

STEMI : ST elevation myocardial infarctus (infarctus du myocarde avec sus-décalage du segment ST)

TLR : toll like receptor (récepteur de type toll)

TNF- α : tumor necrosis factor alpha (facteur de nécrose tumorale alpha)

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1 (cellule d'adhésion vasculaire-1)

Revue bibliographique

I LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES (MCV) :

I.A Epidémiologie

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de mortalité dans le monde avec plus de 17,6 millions de décès par an, suivies des cancers (8,9 millions) et des maladies respiratoires chroniques (3,5 millions) (Naghavi et al., 2017). Les MCV regroupent un ensemble de troubles affectant les vaisseaux sanguins et le cœur. Parmi ces MCV, on retrouve les cardiopathies coronariennes, les maladies vasculaires cérébrales, les cardiopathies hypertensives, les myocardiopathies et les myocardites, la fibrillation et le "flutter" auriculaire. Sur ces 17,6 millions de décès, 15 millions (85,1%) sont attribuables aux cardiopathies coronariennes et aux maladies vasculaires cérébrales. Ce nombre n'a cessé d'augmenter durant ces dernières décennies, en raison notamment d'une croissance démographique importante et du vieillissement de la population. En revanche, entre 2006 et 2016, le taux de mortalité standardisé sur l'âge a diminué de 14,5%, ce phénomène étant essentiellement observé dans les pays à hauts revenus (Wang et al., 2016).

	Cardiovascular disease (total)		Coronary heart disease		Cerebrovascular disease		Other cardiovascular diseases	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Males								
Total deaths (all ages)	1 829 496	40	874 920	19	417 113	9	537 463	12
Premature deaths—before age 75	899 415	35	465 842	18	191 819	8	241 754	9
Premature deaths—before age 65	490 221	31	252 427	16	93 131	6	144 663	8
Females								
Total deaths (all ages)	2 173 136	49	892 297	20	599 380	14	681 459	15
Premature deaths—before age 75	507 625	36	227 140	16	146 142	10	134 343	9
Premature deaths—before age 65	193 143	26	77 629	10	53 424	7	62 090	8
Total								
Total deaths (all ages)	4 002 632	45	1 767 217	20	1 016 493	11	1 218 922	14
Premature deaths—before age 75	1 407 040	35	692 982	17	337 961	9	376 097	9
Premature deaths—before age 65	683 364	29	330 056	14	146 555	6	206 753	9

Latest available years for each country are the same as those presented in Table 2, except for: Albania (2009), Lithuania (2013), Monaco (1987), Slovakia (2014), Tajikistan (2005), and Turkmenistan (2013).
²No data are available for Andorra.
 Source: WHO Mortality Database.

Figure 1 : Nombre et pourcentage de décès liés aux maladies cardiovasculaires en Europe (Townsend et al., 2016).

En Europe, les maladies cardiovasculaires sont responsables de plus de 4 millions de décès par an, soit environ 45% des décès toutes causes (Townsend et al., 2016). Les hommes et les femmes ne sont pas égaux face à ces pathologies. Plus de femmes que d'hommes meurent par an de MCV (49% vs 40%) alors que le nombre de décès par an imputable aux cardiopathies ischémiques est le même entre les femmes et les hommes (892 297 vs 874 920) (Figure 1). Ces différences s'expliquent en grande partie par une mortalité liée à un accident vasculaire cérébrale (AVC) plus importante chez les femmes que chez les hommes (599 380 vs 417 113 décès par an), en raison notamment de facteurs de risque clés de l'AVC retrouvés plus fréquemment chez la femme, comme l'âge, l'hypertension et la fibrillation auriculaire (Cordonnier et al., 2017).

La réduction du nombre de décès imputables aux MCV est essentiellement attribuable à une amélioration du diagnostic, des politiques de prévention et des thérapies. Ces efforts incluent une diminution du tabagisme, une meilleure prise en charge des patients suite à un accident coronarien ou vasculo-cérébral, des avancées scientifiques majeures et une sensibilisation du public aux mesures hygiéno-diététiques.

I.B Les cardiopathies ischémiques

En 2015, les cardiopathies ischémiques représentaient la principale cause de décès dans le monde, avec plus de 9,5 millions de décès (Naghavi et al., 2017). Elles regroupent un ensemble de troubles liés à des insuffisances d'apport en oxygène au muscle cardiaque. Le syndrome coronarien aigu (SCA), principalement causé par la rupture ou l'érosion de plaques d'athérome, est la manifestation clinique la plus fréquente des cardiopathies ischémiques (Crea et Libby, 2017 ; Fuster, 1994). D'autres mécanismes, moins fréquents, peuvent être à l'origine du SCA en absence d'occlusion des artères coronaires (MINOCA) (Niccoli et al., 2015), comme par exemple le spasme coronaire (angor de Prinzmetal). L'expression clinique du SCA est variée et comprend l'angor instable et l'infarctus du myocarde aiguë (IMA). Ils traduisent une ischémie myocardique aiguë et résultent en une diminution de l'apport en oxygène et en nutriments au muscle cardiaque entraînant une nécrose des territoires en aval de la sténose. Les principales complications de l'IMA sont la mort subite (Davies and Thomas,

1984), l'insuffisance cardiaque aiguë puis chronique et des troubles du rythme cardiaque.

La société européenne de cardiologie (ESC) et le collège américain de cardiologie (ACC) ont proposé conjointement une définition universelle de l'infarctus du myocarde (IM) en 1999 précisant entre autres les critères diagnostiques de l'IMA, sa classification, et ses manifestations par électrocardiogramme (ECG) (NSTEMI, STEMI) (Alpert et al., 2000). En raison des avancées dans la recherche biomédicale, cette définition a évolué, par l'ajout notamment de l'utilisation de biomarqueurs sériques plus sensibles et spécifiques, permettant la détection de l'IDM de petite taille (Thygesen et al., 2007). Dans la dernière définition (Expert Consensus Document. Third Universal Definition of Myocardial Infarction, 2013), il est précisé, entre autres, que le diagnostic de l'IM doit s'appuyer sur la détection d'une variation (augmentation et/ou diminution) de la troponine associée à au moins un des paramètres suivants :

- symptômes d'IM,
- modifications de l'ECG,
- évidence d'une nouvelle perte de viabilité myocardique,
- identification d'un thrombus intracoronaire.

On appelle IM, tout évènement ayant eu pour conséquence une nécrose myocardique dans un contexte clinique d'ischémie myocardique aiguë. En fonction de la sévérité de l'infarctus du myocarde aigu (occlusion totale ou partielle de la lumière du vaisseau), celui-ci est divisé en 2 catégories selon le décalage du segment ST à l'ECG :

- SCA avec sus-décalage persistant (>20 min) du segment ST (STEMI) : il correspond à l'oblitération complète d'une large artère coronaire entraînant une nécrose myocardique. Les patients présentent des douleurs thoraciques aiguës (irradient bras gauche, cou ou mâchoire).
- SCA sans sus-décalage persistant du segment ST (NSTEMI) : occlusion partielle de la lumière des vaisseaux avec douleur thoracique.

Ces 2 types de SCA ne touchent pas de la même manière la population. Les STEMI sont plus fréquents chez les sujets jeunes et de sexe masculin (Khera et al., 2015).

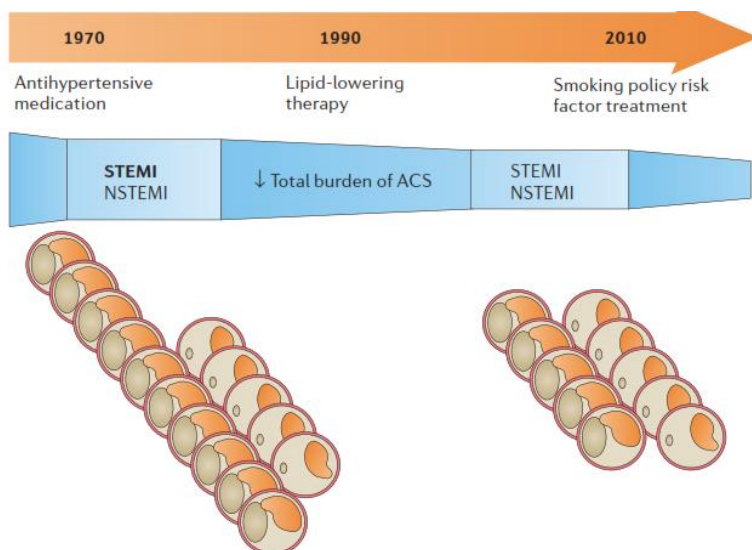


Figure 2 : Déclin de la mortalité et des hospitalisations associé à une diminution de l'incidence des STEMI chez des personnes ayant un antécédent cardiovasculaire (SCA, AVC) (Paterkamp, den Ruijeter et Libby, 2017).

L'incidence relative des STEMI et NSTEMI a évolué au cours des 40 dernières années notamment du fait de l'amélioration de la prise en charge des patients (procédure de revascularisation plus fréquente, traitements thérapeutiques) et d'une réduction des facteurs de risque (Pasterkamp et al., 2017) (Figure 2). Le

déclin de l'incidence des STEMI explique en grande partie la nette diminution du taux de mortalité liée aux IM. En France, l'étude FAST-MI a permis de suivre l'évolution de la mortalité liée aux IM sur les 20 dernières années. Chez les STEMI, le taux de mortalité à 6 mois n'a cessé de diminuer. D'un taux à 17,2% en 1995, il est passé à 6,9% en 2010 et à 5,3% en 2015 (Puymirat et al., 2017). En revanche, la mortalité à 6 mois chez les patients présentant un IM sans sus-décalage du segment ST s'est stabilisée depuis 2010. Malgré la diminution de leur incidence, les SCA restent des accidents graves avec une morbi-mortalité à moyen terme élevée.

La classification universelle de l'infarctus du myocarde présentée dans sa troisième définition définit l'IM en 5 types, selon des caractéristiques pathologiques, pronostiques et cliniques :

- Type 1 : IM spontané (maladie coronarienne fréquemment présente mais non exclusive)
- Type 2 : IM secondaire (absence de toute maladie coronarienne sous-jacente)
- Type 3 : IM suivi de décès lorsque les valeurs des biomarqueurs ne sont pas disponibles
- Type 4a : IM associé à une angioplastie
- Type 4b : IM associé avec une thrombose de stent
- Type 5 : IM associé à un pontage coronaire

La stratification du risque de mortalité est une étape primordiale dans la prise en charge des SCA. Parmi les scores pronostiques à disposition des cliniciens (GRACE, EMMACE, SRI...), l'European Society of Cardiology (ESC) préconise de déterminer ce risque à partir du score GRACE (Global Registry of Acute Coronary Events) pour sa bonne valeur discriminative (Granger et al., 2003). Ce score est basé sur différents critères tels que l'âge du patient, les résultats de l'examen clinique (tension artérielle, taux de créatinine, décalage du segment ST) et permet de définir 3 niveaux de risque de mortalité intra hospitalier et à moyen terme (6 mois):

A l'hôpital :

- Risque faible (<1%, score ≤ 108)
- Risque intermédiaire (1-3%, score entre 109 et 140)
- Risque élevé (>3%, score >140)

Six mois après sortie de l'hôpital :

- Risque faible (<3%, score ≤ 108)
- Risque intermédiaire (3-8%, score entre 109 et 140)
- Risque élevé (>8%, score >140)

Ce score permet donc d'améliorer, en fonction de son risque, la prise en charge du patient (interventionnelle ou thérapeutique).

La prise en charge des SCA présentant un STEMI repose sur 3 étapes (Ibanez et al., 2018) :

- L'examen clinique initial (ECG, dosage sérique) et l'interrogatoire.
- La validation du diagnostic et la stratification du risque de mortalité et de saignement.
- La stratégie d'imagerie invasive et non-invasive, selon le risque de mortalité.

I.C L'Accident vasculaire cérébrale (AVC)

Les AVC représentent la deuxième cause de décès dans le monde avec plus de 5,5 millions de mort en 2016 (Naghavi et al., 2017). La diminution du taux de mortalité concernant les MCV, standardisé pour l'âge, est en grande partie

attribuable à la diminution du taux de mortalité lié aux maladies cérébro-vasculaires. Entre 2006 et 2016, ce taux de mortalité standardisé est passé de 116 décès pour 100 000 à 86,5 décès pour 100 000.

En France, ils représentent la première cause de handicap, la troisième cause de mortalité, et la deuxième cause de démence.

On distingue 3 types d'AVC :

- L'accident ischémique : le plus fréquent des AVC, il résulte de l'obstruction d'une artère cérébrale.
- L'hémorragie cérébrale : responsable du plus grand nombre de décès.
- L'accident ischémique transitoire (AIT) : les symptômes sont identiques à ceux de l'AVC mais sont transitoires, de quelques secondes à quelques minutes.

I.D Artériopathie obstructive des membres inférieurs (AOMI)

L'AOMI est caractérisée par un rétrécissement du calibre des artères des membres inférieurs, se traduisant par une chute de l'index de pression systolique (PS à la cheville / PS humérale). Dans 90 à 95% des cas, l'athérosclérose est la cause des AOMI. Selon la classification de Leriche et Fontaine, on distingue 4 stades :

- Stade I : asymptomatique avec présence d'une oblitération sans conséquence fonctionnelle
- Stade II : symptomatique à l'effort
- Stade III : ischémie permanente
- Stade IV : présence d'une nécrose, d'ulcère ou de gangrène

Cette pathologie touche environ 200 millions de personnes dans le monde (Fowkes et al., 2013). La prévalence est légèrement plus élevée chez les femmes que chez les hommes (12,3% vs 10,1%), pour une population d'âge compris entre 75 et 79 ans (Fowkes et al., 2017).

I.E Facteurs de risque

Les études épidémiologiques ont joué un rôle important dans l'élucidation des facteurs de risque prédisposant aux maladies cardiovasculaires, notamment l'étude Framingham qui débuta en 1948, sous la direction de Thomas Royle Drawer. Cette étude a permis d'identifier pour la première fois l'hypercholestérolémie et l'hypertension comme des facteurs de risque majeurs de la survenue d'évènements cardiovasculaires (Kannel et al., 1961). De nombreuses études prospectives ont été réalisées depuis, mettant en évidence d'autres facteurs. Parmi ces facteurs de risque identifiés, 9 participent pour plus de 90% des risques d'IM (INTERHEART) et d'AVC (INTERSTROKE). On retrouve la dyslipidémie, l'hypertension artérielle, le diabète, l'obésité et l'insulino-résistance (Wang et al., 2016). Des facteurs environnementaux tels que le tabac, une alimentation riche en lipides et la sédentarité participent également au développement de ces pathologies.

Les facteurs de risque susceptibles de jouer un rôle dans la survenue d'une maladie cardiovasculaire peuvent être classés selon différentes catégories :

- Non-modifiables : l'âge, le sexe, les antécédents familiaux d'accident cardiovasculaire précoce, et l'origine ethnique
- Modifiables : liés à une habitude de vie, que l'on peut transformer (le tabagisme, l'hypertension artérielle, le diabète, l'hypercholestérolémie, l'obésité, la sédentarité)
- Nouveaux facteurs de risque : protéine C réactive (CRP), score coronaire calcique.

I.E.1 *Facteurs de risque non modifiables*

I.E.1.1 Âge

Parmi les facteurs de risque non modifiables, l'âge est celui qui prédomine (North et Sinclair, 2012). En effet, la prévalence et l'incidence des MCV augmentent de manière exponentielle avec l'âge. D'ici à 2030, environ 20% de la population aura plus de 65 ans, représentant un défi majeur pour notre société et nos systèmes de santé. Aux Etats-Unis, les modèles prédictifs liés à cette augmentation pronostiquent une augmentation des dépenses de santé dans les 20 prochaines années de plus de 200% (Heidenreich et al., 2011). Il est donc

primordial de comprendre les mécanismes qui contribuent à l'augmentation du risque cardiovasculaire. L'altération fonctionnelle et structurelle des artères qui accompagnent le vieillissement sont des phénomènes complexes. Les principales modifications sont une dysfonction endothéliale et une rigidité artérielle (Celermajer et al., 1994), (Vita et al., 1990). L'augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation seraient les principaux mécanismes sous-jacents favorisant le vieillissement artériel (Paneni et al., 2017).

I.E.1.2 Sexe

Le sexe est également un facteur de risque important. Le risque de MCV est plus élevé chez les hommes que chez les femmes. Cette différence pourrait s'expliquer par le rôle supposé cardioprotecteur des hormones œstrogènes (Mendelsohn et Karas, 1999). Néanmoins, il n'a toujours pas été prouvé par des études cliniques de grande ampleur l'effet bénéfique des œstrogènes sur le risque d'évènement cardiovasculaire. En revanche, post-ménopause, le risque augmente et devient plus important pour les femmes de plus de 65 ans.

I.E.1.3 Antécédents familiaux

Les antécédents familiaux constituent un facteur majeur de risque de MCV. D'après les résultats de l'étude Framingham, l'existence d'un antécédent familial chez l'un des 2 parents multiplie le risque de MCV par 3 (Banerjee, 2012). Ce facteur de risque est d'autant plus important si l'évènement est apparu avant 45 ans pour les hommes et avant 55 ans pour les femmes.

I.E.2 *Facteurs de risque modifiables*

Deux tiers des décès imputables aux maladies cardiovasculaires pourraient être évités par des politiques de prévention visant à réduire les facteurs de risque modifiables (tabagisme, taux de cholestérol, pression artérielle...) (Jousilahti et al., 2016).

I.E.2.1 Hypercholestérolémie

L'hypercholestérolémie est un facteur de risque majeur pour l'infarctus du myocarde (InterHEART) (Yusuf et al., 2004). Des taux élevés de LDL-C sont prédictifs d'une augmentation du risque cardiovasculaire (Figure 3). De nombreuses études précliniques chez des modèles de souris déficientes ou Knock-Out (KO) pour des gènes impliqués dans le transport et l'élimination des LDL-C (LDLR, ApoB, PCSK9), ont mis en évidence une relation directe entre l'athérosclérose et l'hypercholestérolémie. Par exemple, l'hypercholestérolémie familiale qui correspond à un trouble génétique autosomique de certains de ces gènes (LDLRAP1, ApoB, PCSK9) entraîne des augmentations importantes du taux de LDL-C, associées à une augmentation du risque cardiovasculaire dépendant en partie de la nature de la mutation (Kjærgaard et al., 2017). De même chez l'homme, des mutations sur certains gènes entraînant une réduction du taux de LDL-C ont été associées à des effets cardioprotecteurs.

L'ESC a récemment publié les résultats obtenus par un panel de cardiologues analysant plus de 200 études de cohortes incluant environ 2 millions de participants et portant sur le lien entre les LDL-C et les maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose (Ference et al., 2017). Le résultat majeur est que de nombreuses preuves génétiques et cliniques confirment que les LDL-C sont à l'origine des pathologies cardiovasculaires, plus particulièrement celles induites par l'athérosclérose.

L'ESC recommande, dans ses dernières "guidelines", de réduire le taux de LDL-C en dessous des 70 mg/dl chez les patients à très haut risque, et en dessous de 100 mg/dl pour les personnes à haut risque cardiovasculaire.

I.E.2.2 Le diabète

Le diabète regroupe un ensemble de maladies métaboliques chroniques qui sont caractérisées par une augmentation de la glycémie à jeun ($>1,26$ g/l ou 7 mM). Le diabète de type 1 est plus fréquent chez les sujets jeunes et est généralement associé à une maladie auto-immune induisant une destruction des cellules β des îlots de Langerhans, résultant en un déficit de production d'insuline. Le diabète de type 2, que l'on retrouve généralement chez les personnes plus âgées, est

caractérisé par une insulino-résistance et une dérégulation des cellules β pancréatiques (Kahn et al., 2014). Entre 1980 et 2014, la prévalence mondiale du diabète a quasiment doublé, passant de 4,7% à 8,5%, et les projections d'ici à 2030 sont inquiétantes avec plus de 500 millions de personnes potentiellement atteintes (Whiting et al., 2011).

Environ 30 à 40% des patients présentant un syndrome coronarien aigu sont diabétiques (Zeller et al., 2005). De plus, chez ces patients, de nombreuses études épidémiologiques (MIRACL, WIZARD et TNT) ont montré une augmentation du risque de récurrence d'évènements cardiovasculaires, compris entre 33% et 44% (Everett et al., 2013). L'insulino-résistance favorise l'apparition d'une dyslipidémie, elle induit des modifications des lipoprotéines par l'augmentation du stress oxydatif et des glycosylations. Le diabète et l'athérosclérose sont étroitement liés. La dysfonction endothéliale, marqueur du stade précoce de l'athérosclérose, est induite par la formation de radicaux libres liés à une hyperglycémie (Tesfamariam et Cohen, 1992). L'hyperglycémie induit également la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses dans l'espace sous-endothélial par l'activation du facteur de croissance à l'insuline (IGF-1). Une augmentation de marqueurs circulants pro-inflammatoires (IL-6, CRP) chez des patients diabétiques de type 2 a été observée dans une étude épidémiologique portant sur 550 participantes, suggérant un rôle possible du processus inflammatoire sur le développement de la pathologie (Pradhan A.D, 2001) Tous ces mécanismes participent également au développement de l'athérosclérose et expliqueraient en partie le lien entre maladies métaboliques et maladies cardiovasculaires.

Les recommandations de l'ESC préconisent chez les patients à haut risque cardiovasculaire de réduire le taux d'hémoglobine glyquée en dessous de 7% (<53 mmol/l).

I.E.2.3 Le tabagisme

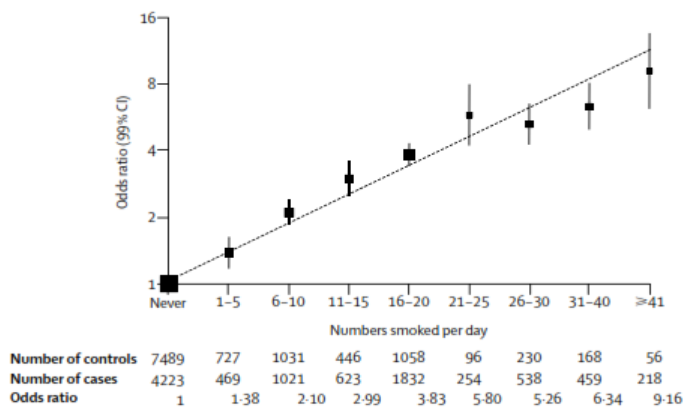


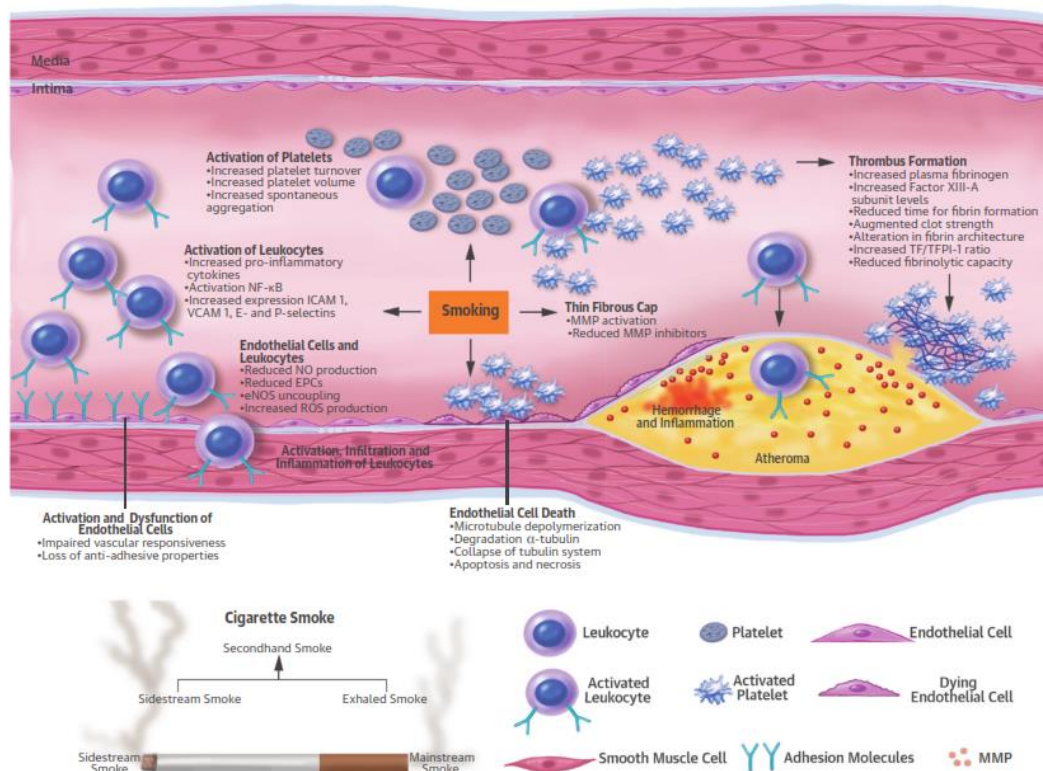
Figure 4 : Relation linéaire entre le nombre de cigarettes fumées et le risque d'IM (Yusuf et al., 2004).

a confirmé l'importance du tabagisme, qu'il soit passif ou actif, sur la survenue d'évènements cardiovasculaires (Yusuf et al., 2004). D'après cette étude, le risque d'IM est proportionnel à la consommation de cigarettes fumées (Figure 4), et représente le deuxième facteur de risque modifiable après les dyslipidémies.

Le tabagisme est reconnu comme étant un facteur de risque indépendant favorisant l'athérosclérose (Ambrose et Barua, 2004). Les mécanismes par lesquels le tabagisme augmenterait le risque d'évènements cardiovasculaires sont multiples (Figure 5) (Morris et al., 2015). Le tabac entraînerait des modifications de la vasomotricité des artères notamment par l'augmentation du stress oxydatif, expliquant la fréquence accrue des spasmes coronaires chez les fumeurs. Fumer est associé à une dysfonction endothéliale, une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion cellulaire solubles (VCAM-1, ICAM-1) (Barua et Ambrose, 2013) et également à une augmentation des marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6 et TNFα) (Moghbeli et al., 2005).

Les nouvelles recommandations européennes sur la prévention des MCV préconisent un arrêt total et définitif de l'exposition au tabac sous quelque forme que ce soit, permettant de normaliser le risque au bout de 2 ans.

Le risque de développer une MCV est 2 à 4 fois plus élevé chez le fumeur. Chez le sujet âgé de moins de 50 ans, le risque de STEMI est multiplié par 8 en comparaison de sujets non-fumeurs ou ayant arrêté (Lloyd et al., 2017). L'étude INTERHEART réalisée sur plus de 30 000 participants



Morris, P.B. et al. J Am Coll Cardiol. 2015; 66(12):1378-91.

Figure 5 : L'exposition à la fumée de cigarette, qu'elle soit directe ou indirecte, induit une activation des CE, leur dysfonction, puis leur apoptose entraînant l'infiltration de cellules de l'immunité et de lipides dans l'espace sous-endothélial. De plus, la fumée de cigarette provoque l'activation des plaquettes et des leucocytes, libérant des médiateurs pro-inflammatoires et conférant aux plaques d'athérome un phénotype instable (Morris et al., 2015).

I.E.2.4 Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle touche en particulier les personnes de plus de 60 ans et affecte environ 1 milliard d'adultes dans le monde (Kearney et al., 2005). Chez les personnes de plus de 50 ans, des études ont montré que l'élévation de la pression artérielle systolique (PAS) était un meilleur facteur prédictif du risque cardiovasculaire que la pression diastolique. Ce risque cardiovasculaire augmente dès que la pression artérielle systolique est supérieure à 115 mmHg.

Des études cliniques ont montré que le traitement de l'hypertension artérielle permettait de réduire le risque cardiovasculaire, notamment le risque d'AVC (de 35 à 40%) et d'IM (de 15 à 20%) (Psaty et al., 1998). Ces résultats ont été confirmés dans une méta-analyse regroupant environ 120 000 patients, suggérant que pour chaque diminution de la PAS de 5 mmHg, une réduction du risque cardiovasculaire d'environ 17% était associée (Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration, 2013). Les recommandations de 2017 ont fixé

à 140 mmHg la valeur cible thérapeutique à atteindre chez les patients hypertendus à haut risque cardiovasculaire. Toutefois, il semblerait que la réduction de ce seuil puisse apporter des effets cardioprotecteurs supplémentaires.

L'étude SPRINT publiée en 2015, en a apporté les premiers éléments de réponse. En effet, il a été montré dans cette étude que l'ajout d'un médicament antihypertenseur chez des personnes âgées de plus de 50 ans, hypertendues sous traitement (>140 mmHg), permettait de diminuer la survenue de complications cardiovasculaires avec une valeur cible de PAS à 120 mmHg. Ces résultats suggèrent qu'une diminution de la PAS en dessous des valeurs recommandées par l'ESC serait bénéfique chez des patients non diabétiques (The SPRINT Research Group, 2015).

I.E.2.5 L'obésité

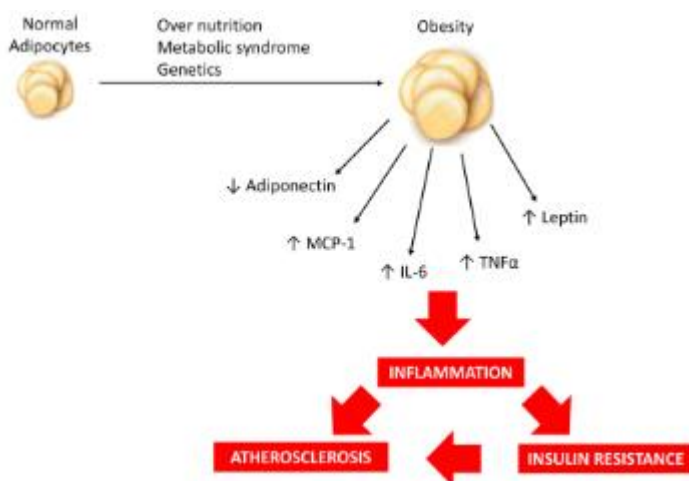


Figure 6: La surnutrition, le syndrome métabolique et/ou des prédispositions génétiques contribuent au développement de l'obésité entraînant une modification du profil d'adipokines et la génération d'une inflammation de bas grade, associée à une augmentation du risque d'athérosclérose et d'insulino-résistance (Freitas Lima et al., 2015).

L'obésité se définit par un indice de masse corporelle ou IMC (poids en kg / taille en m²) supérieur à 30. D'après une étude épidémiologique recensant depuis 1975 le poids et la taille de plus de 130 millions de personnes âgées de plus de 5 ans, le nombre d'enfants et d'adolescents obèses a été multiplié par 10, passant leur nombre de 11 millions en

1975 à 124 millions en 2016 (Abarca-Gómez et al., 2017). Au vu de sa progression exponentielle et de son association directe avec la survenue d'IM (Yusuf et al., 2004), l'obésité constitue un véritable problème de santé publique. De plus, cet effet est potentialisé par l'apparition d'autres facteurs de risque aggravants liés à l'obésité (hypertension, diabète).

L'obésité abdominale serait plus particulièrement responsable des complications cardiovasculaires. Le tissu adipeux viscéral, par la libération de facteurs pro-

thrombogènes (PAI-1) et pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α) contribuerait directement à la progression de l'athérosclérose (Figure 6) (Freitas Lima et al., 2015).

I.E.2.6 Inactivité physique

L'organisation mondiale de la santé estimait en 2008, sur des personnes interrogées dans plus de 120 pays et âgées de plus de 15 ans, qu'environ 30% des personnes étaient considérées comme inactives. L'inactivité physique est responsable d'environ 3,2 millions de décès par an dans le monde et fait partie de l'un des quatre principaux facteurs de risque impliqués dans l'augmentation du risque de maladies non transmissibles.

L'inactivité physique est définie comme un niveau insuffisant d'activité physique d'intensité modérée à élevée, inférieur au seuil d'activité physique recommandé.

Il existe une relation inverse entre l'activité physique et les risques de MCV (Wen et al., 2011), (Sattelmair et al., 2011). De nombreuses études ont montré les bénéfices multifactoriels d'une activité physique, notamment des modifications systémiques importantes au niveau de la pression artérielle, des muscles squelettiques, de la fonction endothéliale, et un effet préventif sur la survenue d'IM. De plus, ces études ont montré chez des personnes pratiquant une activité physique d'intensité modérée d'une durée minimum de 150 min par semaine, une diminution comprise entre 15 à 20% du risque de SCA en comparaison à des personnes sédentaires (Woodcock et al., 2011).

Les dernières recommandations sont en accord avec ces résultats puisqu'il est conseillé pour chaque adulte de pratiquer une activité physique d'intensité modérée pendant au minimum 150 min ou d'intensité élevée pendant plus de 75 min par semaine (Physical Activity and Public Health: Updated Recommendation for Adults From the American College of Sports Medicine and the American Heart Association, 2007).

De nombreuses études décrivent une relation en J entre le risque de survenue d'accidents cardiovasculaires et la consommation d'alcool (Bo et al., 2017). Il semblerait que l'effet bénéfique d'une faible consommation d'alcool soit principalement attribuable à l'augmentation du taux de HDL (Brien et al., 2011). Néanmoins, cet effet cardioprotecteur serait à nuancer puisque de nombreux biais existent dans ces études observationnelles. Afin de s'affranchir de l'influence de facteurs confondants, une étude randomisée mendélienne s'appuyant sur un variant génétique (rs1229984) du gène ADH1B a été utilisée comme variable instrumentale dans une étude portant sur plus de 260 000 participants. Le variant du gène ADH1B codant pour l'alcool déshydrogénase 1B a été associé à une diminution de la dépendance à l'alcool, de son métabolisme et de sa consommation. Dans cette étude, les auteurs ont observé une diminution du risque cardiovasculaire chez les porteurs de ce variant génétique en comparaison du groupe ayant une consommation modérée d'alcool. Ces résultats suggèrent qu'une réduction de consommation d'alcool, même chez les participants ayant une consommation faible voir modérée d'alcool, serait bénéfique (Holmes et al., 2014). Néanmoins, cette étude n'est pas sans limitations, notamment concernant l'effet du variant génétique en question sur le risque d'évènement cardiovasculaire indépendant de son effet médié par l'alcool. Par conséquent, il est difficile de conclure catégoriquement sur l'effet bénéfique d'une réduction d'alcool pour les consommations modérées, notamment puisque de récentes études décrivent toujours une courbe en J pour la survenue d'évènements cardiovasculaires en fonction de la consommation d'alcool (Haseeb, Alexander, et Baranchuk, 2017).

En revanche, les fortes consommations d'alcool sont associées à une augmentation du risque cardiovasculaire avec notamment une augmentation du risque d'IM (Leong et al., 2017). Les mécanismes biologiques sont complexes et induiraient une augmentation de la pression artérielle, une augmentation du stress oxydatif, de l'inflammation, ainsi que de l'agrégation plaquettaire. Les dernières recommandations suggèrent de limiter la consommation d'alcool à 2 verres de vin par jour pour les hommes et 1 pour les femmes, correspondant à 26 g et 13 g d'éthanol pur par jour respectivement (Haseeb, Alexander, et Baranchuk, 2017).

Parmi les facteurs de risque environnementaux ayant un effet sur la santé, les particules fines et la pollution de l'air domestique sont les plus importants (GBD 2015 DALYs and HALE Collaborators, 2016). Les expositions aiguës et chroniques aux particules fines (<2,5 µm de diamètre) sont associées à une augmentation du risque d'IM, d'AVC et d'insuffisance cardiaque induits par des mécanismes biologiques tels que la dysfonction endothéliale, l'athérosclérose et l'hypertension (Cosselman et al., 2015). L'une des hypothèses mécanistiques expliquant l'effet de ces facteurs environnementaux sur le risque de MCV impliquerait l'activation de récepteurs sensoriels par l'inhalation de ces particules, induisant une dérégulation du système nerveux végétatif (Figure 7). Une deuxième hypothèse serait liée à l'augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation suite à l'exposition aux microparticules, résultant en une activation de l'endothélium et de la coagulation (Brook et al., 2010; Newby et al., 2015).

Il semblerait que ces 2 mécanismes physiologiques ne soient pas exclusifs, et qu'ils partagent des voies de signalisation identiques.

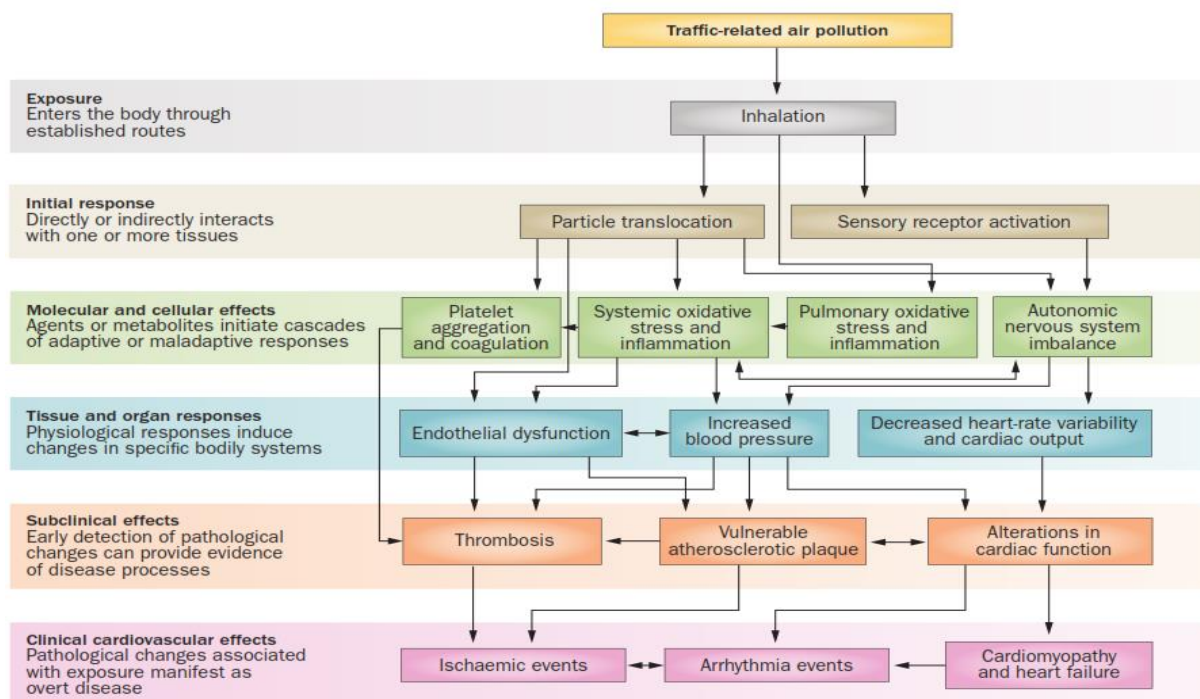


Figure 7 : Effets cardiovasculaires et mécanismes biologiques proposés liés à une exposition chronique aux gaz d'échappement automobile. L'inhalation de polluant peut induire un effet biologique localisé ou systémique. L'augmentation de l'exposition à ces polluants peut déclencher des événements cardiovasculaires chez les individus les plus sensibles (Cosselman, Navas-Acien, et Kaufman, 2015).

I.E.2.9 Le stress chronique

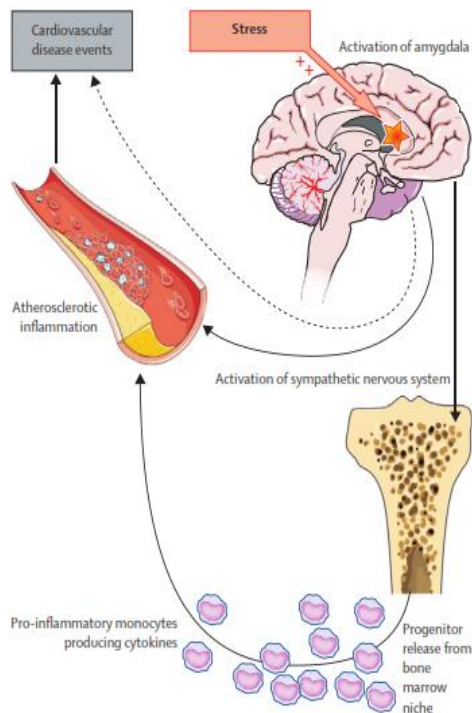


Figure 8 : Deux mécanismes biologiques seraient impliqués dans le lien étroit entre l'activité de l'amygdale et le risque d'évènement cardiovasculaire. L'un dépend du système nerveux sympathique et le second, mis en évidence dans cette étude, serait lié à l'activation de la moelle osseuse entraînant une augmentation des leucocytes impliqués dans le processus inflammatoire de l'athérosclérose (Tawakol et al., 2017).

Le stress chronique est associé à une augmentation du risque de MCV par l'aggravation d'autres facteurs de risque dont notamment l'hypertension (Nabi et al., 2013). Les mécanismes restent encore méconnus mais dans une étude publiée en 2017 par Tawakol et al, des chercheurs du "Massachusetts Hospital et de la Harvard Medical School" ont mis en évidence grâce à l'imagerie nucléaire au fluorodéoxyglucose (FDG) qu'une augmentation de l'activité métabolique de l'amygdale, région du cerveau impliquée dans le stress, était associée à un risque plus élevé d'évènement cardiovasculaire (Tawakol et al., 2017). Il semblerait, selon les auteurs de cette étude, que l'activation de l'amygdale entraînerait une augmentation de l'activité de la moelle osseuse (augmentation des leucocytes) et de l'inflammation artérielle, qui seraient responsables de cette élévation du risque d'évènement cardiovasculaire (Figure 8).

I.E.2.10 Les agents infectieux

Les maladies infectieuses chroniques et l'athérosclérose partagent de nombreux mécanismes biologiques. Les premières évidences expérimentales d'un lien entre agents pathogènes et athérosclérose ont été proposées en 1978 dans un article publié par Fabricant et al. (Fabricant et al., 1978), dans lequel les auteurs avaient mis en évidence le rôle d'un herpès virus (virus de la maladie de Marek) dans l'induction de l'athérosclérose chez le poulet. D'autres études ont par la suite montré, chez l'homme, la présence d'organismes bactériens et viraux (cytomegalovirus, HIV, pathogènes parodontaux...) au sein des lésions. Deux mécanismes ont été proposés afin d'expliquer l'hypothèse infectieuse de

l'athérosclérose. L'un des mécanismes serait lié à la présence d'agents infectieux au sein des lésions. Ils agiraient aux différentes étapes de l'athérosclérose : au stade précoce par l'induction de molécules d'adhésion cellulaire (VCAM-1 et ICAM-1) et de chimiokines (MCP-1), au stade avancé par l'activation de la prolifération des cellules musculaires lisses (Pothineni et al., 2017), et au stade compliqué par l'augmentation de l'expression de métalloprotéases (MMP-2, MMP-9) et de facteurs pro-thrombogènes (PAI-1). Le deuxième mécanisme serait associé à une contribution systémique de la présence d'agents pathogènes. En effet, l'augmentation de l'inflammation systémique, induite par leur présence, entrainerait une augmentation de cytokines pro-inflammatoires, qui activeraient à la fois le système immunitaire inné (TLR, HSP et inflammasome) et acquis (TH1, TH7).

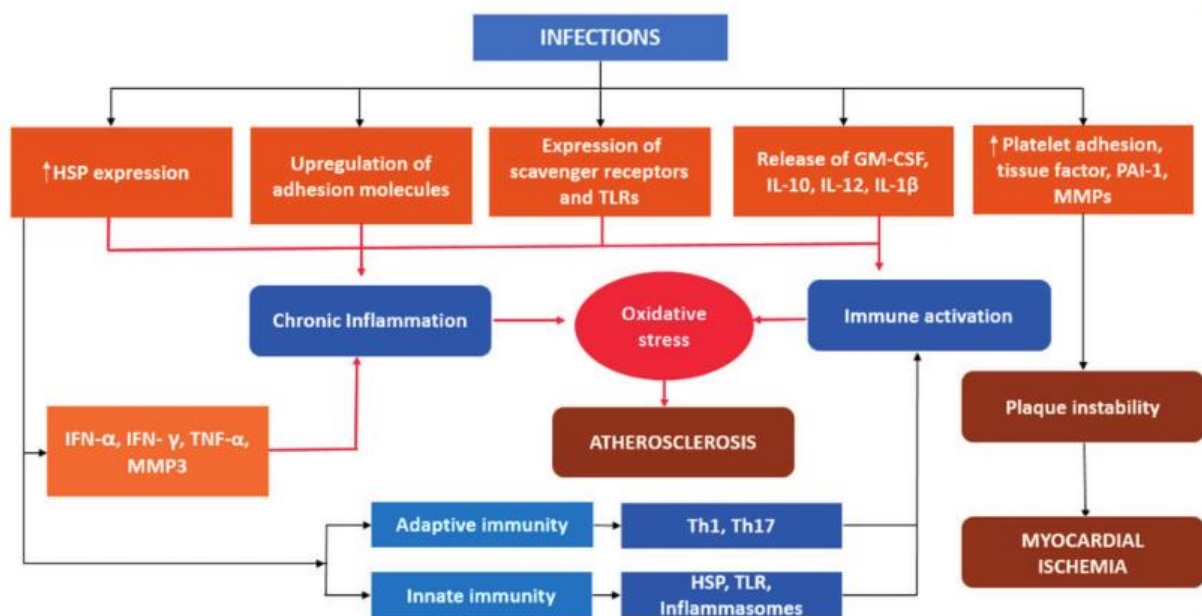


Figure 9 : Schéma des mécanismes pathogéniques induits par l'infection chronique et leur rôle dans l'athérosclérose (Pothineni et al., 2017).

Malgré des liens étroits entre l'athérosclérose et les maladies chroniques infectieuses, aucun essai clinique n'a permis de mettre en évidence un effet bénéfique de thérapies anti-infectieuses sur la survenue de MCV et ainsi de confirmer cette hypothèse.

I.E.3 *Evaluation du risque cardiovasculaire en prévention primaire :*

Les données de l'étude Framingham ont également servi à la mise en place d'un outil de prédiction du risque cardiovasculaire permettant d'identifier le risque coronarien (événements mortels ou non) à 10 ans chez des personnes supposées être en bonne santé. Ce risque absolu ou global est déterminé à partir d'une modélisation qui intègre un ensemble de facteurs de risque. Il prend en compte de nombreux paramètres dont le sexe, l'âge, le taux de cholestérol total, le taux de HDL-C, le tabagisme, la présence d'un diabète, la pression artérielle systolique (PAS). Différents modèles de prédiction du risque cardiovasculaire ont été développés à partir de ces données, tous basés sur la cohorte de Framingham (Wilson et al., 1998 ; D'Agostino et al., 2000).

En revanche, il est difficile de transposer ces modèles à la population européenne puisque cette prédiction du risque coronarien n'est pas la même en fonction de la population étudiée (Haq et al., 1999). C'est pour cette raison que l'Europe, à partir de 2003, a développé un modèle d'évaluation du risque cardiovasculaire adapté au contexte épidémiologique européen en regroupant 12 cohortes européennes, soit 205 178 personnes (Conroy, 2003). Le modèle SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation) prend en compte l'âge, le sexe, le taux de cholestérol total et le tabagisme. A partir de ces différents paramètres, un risque de mortalité cardiovasculaire est estimé à 10 ans chez des personnes entre 40 et 65 ans. La Société Européenne de Cardiologie a dernièrement recommandé d'estimer le risque global cardiovasculaire en se basant entre autres sur la détermination du SCORE (Piepoli et al., 2016). Cette évaluation du risque cardiovasculaire n'est pas la même entre les pays européens puisqu'une différence est faite entre les pays à bas risque (France, Allemagne, Italie...) et les pays européens à haut risque (Hongrie, Russie, Ukraine...). Cette différence a été déterminée en fonction du taux de mortalité ajusté de l'âge (45 à 75 ans) basée sur une étude effectuée en 2012. A partir de cette table, différents niveaux de risque de mortalité à l'échelle d'une population ont été définis (Figure 10) :

- Risque faible voir modéré, <5% (SCORE) : conseils pour maintenir un risque faible/modéré.
- Risque élevé, compris entre 5 et 10% (SCORE) : changement de style de vie préconisé et possible traitement thérapeutique.

- Risque très élevé, >10% (SCORE) : traitement thérapeutique plus fréquent.

De plus, les diabétiques de type 1 et 2 avec une protéinurie ou un facteur majeur de risque cardiovasculaire (tabagisme, dyslipidémie, hypertension artérielle) et les patients avec une insuffisance rénale chronique sévère sont considérés à risque très élevé.

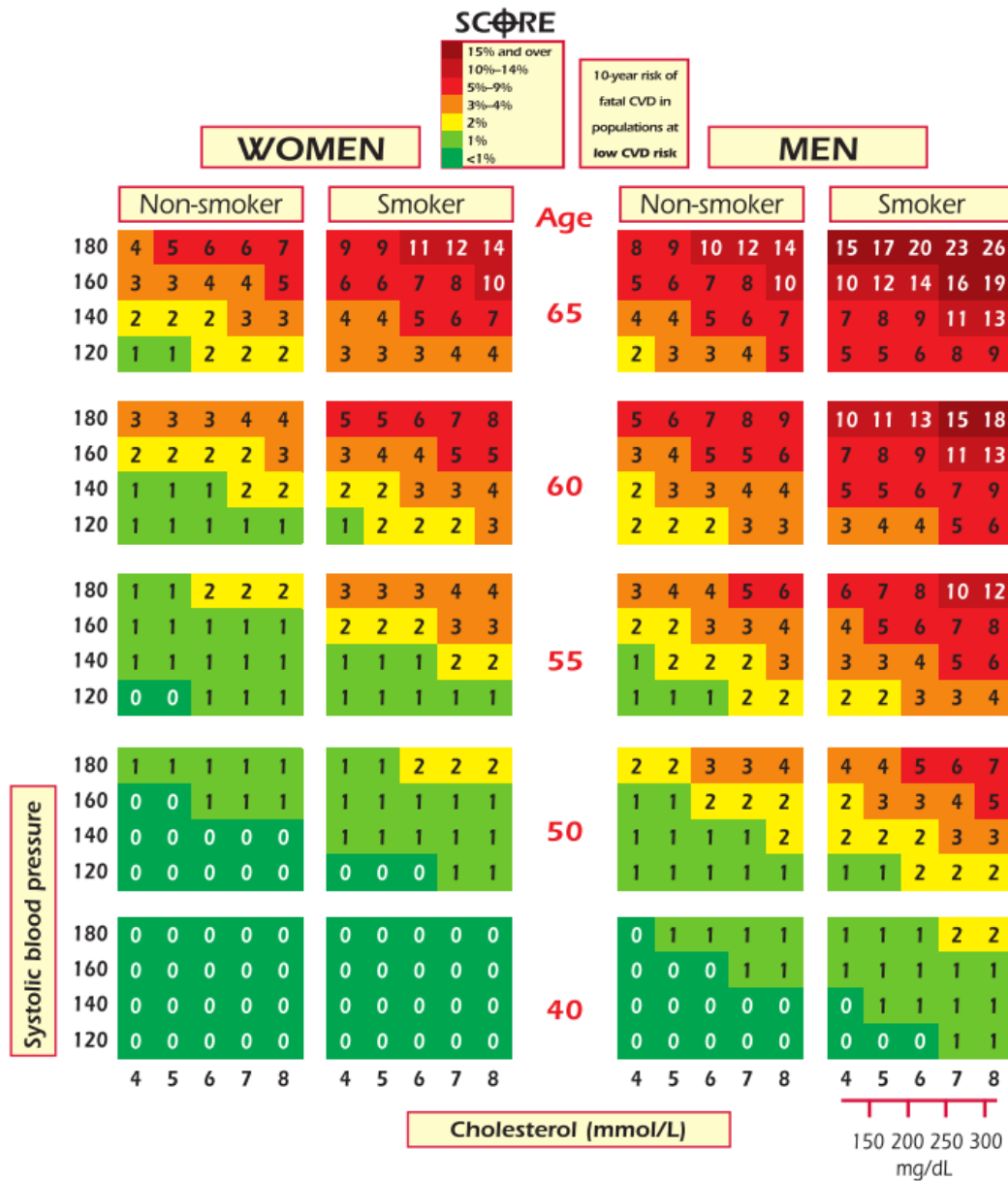


Figure 10 : Tableau de calcul du score de risque de décès cardiovasculaire à 10 ans en prévention primaire en fonction des facteurs de risque suivants : l'âge, le sexe, le statut tabagique, la pression artérielle systolique et le taux de cholestérol total (Piepoli et al., 2016).

Les MCV représentent toujours la première cause de mortalité dans le monde, bien que les taux de mortalité cardiovasculaire ajustés de l'âge aient diminué dans les pays à revenu élevé. L'amélioration de la prise en charge des patients à haut risque cardiovasculaire doit passer par la mise en place d'une stratégie préventive efficace prenant en compte les facteurs de risque les plus importants impliqués dans la maladie coronaire. Le tabac, les taux plasmatiques des lipides (le rapport ApoB/ApoA1), l'hypertension artérielle, le diabète, l'obésité, le régime alimentaire, l'activité physique, la consommation d'alcool et les facteurs psychosociaux comptent pour plus de 90% des risques de faire un IM. Le rapport ApoB/ApoA1 et le tabagisme sont les facteurs de risque les plus puissants, suivis par le diabète et les facteurs psychosociaux (Tableau 1). L'évaluation et la prise en charge de ces facteurs de risque (modifiables et non modifiables) permettent de calculer un risque coronarien (événements mortels ou non) à 10 ans, chez des personnes supposées être en bonne santé (SCORE). Néanmoins, ce modèle prédictif reste incertain à l'échelle de l'individu et nécessite la mise en place d'autres stratégies visant à identifier les personnes à haut risque cardiovasculaire.

Facteurs de risque prédominants dans l'infarctus du myocarde (INTERHEART). Adapté de Yusuf et al. 2004.

	Odd Ratio	Rang
ApoB/ApoA1	3,25	1
Tabagisme	2,87	2
Facteurs psychosociaux	2,67	3
Diabète	2,37	4
Hypertension	1,91	5

II PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ATHEROSCLEROSE

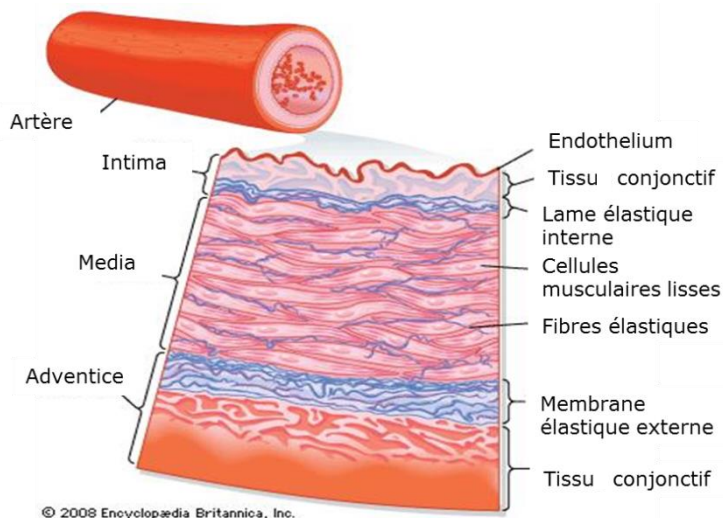
L'athérosclérose est une maladie chronique inflammatoire de l'intima. Elle est caractérisée par l'accumulation de lipides dans la paroi des vaisseaux. Cette pathologie connaît une progression silencieuse (asymptomatique) dans un premier temps, et peut avoir des conséquences cliniques graves, soit par l'obstruction progressive de la lumière des vaisseaux, soit par la survenue d'un évènement aigu athéromateux dans le cœur (infarctus du myocarde), le cerveau (AVC) ou dans les membres inférieurs (AOMI). La cause principale de ces évènements est la rupture d'une plaque vulnérable, indétectable par les techniques d'imagerie actuelles (Little et al., 1988). Les plaques d'athérome vulnérables sont caractérisées par un large corps lipidique et nécrotique, une fine chape fibreuse (<65 μm) et l'infiltration de nombreuses cellules de l'inflammation, notamment des macrophages.

Les modèles expérimentaux animaux ont été indispensables à la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents de l'athérosclérose. A partir des années 1980, et grâce à la mise au point de modèles murins développant spontanément des lésions athéromateuses (Nakashima et al., 1994), les découvertes dans ce domaine n'ont cessé de progresser, avec notamment la mise en évidence de l'inflammation comme principal mécanisme de progression de la pathologie (Hansson et Libby, 2006). Ces lésions athéromateuses se forment essentiellement dans les artères de gros et moyens calibres.

II.A Structure des parois vasculaires

Les artères ont un diamètre qui décroît de l'aorte jusqu'aux artérioles mais elles conservent leur structure histologique qui est composée de 3 feuillets concentriques.

II.A.1 *La tunique interne (intima)*



© 2008 Encyclopædia Britannica, Inc.
Figure 11 : Schéma représentant une artère de moyen calibre et ses trois tuniques : l'intima, la média et l'adventice.

Elle se situe à l'interface entre le sang et la matrice extracellulaire (Figure 11). Elle est constituée d'une seule couche de tissu épithélial. Cette unique couche de cellules endothéliales est caractéristique des épithéliums pavimenteux simples ou épithéliums squameux qui permettent une diffusion sélective.

L'endothélium vasculaire joue un rôle majeur dans divers processus physiologiques tels que l'angiogenèse, la réponse inflammatoire (adhésion des leucocytes), le tonus vasculaire, et la perméabilité (Félétou et Vanhoutte, 2006). Cette tunique est séparée de la média par une lame de fibre élastique constituée d'élastine (*limitante élastique interne*) que l'on ne retrouve que dans les artères de gros calibre.

II.A.2 *La tunique moyenne (média)*

Elle est principalement constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses (CMLs) organisées en anneaux et supportées par du tissu conjonctif composé majoritairement de fibres élastiques. Ces couches sont appelées "unités lamellaires". Dans les artères de conductance comme l'aorte, ou la carotide, la média est délimitée par une lame élastique interne (côté luminal) et une lame élastique externe. Dans les artères mésentériques, la lame élastique externe est fragmentée ou absente.

Les CMLs, sous le contrôle de neurofibres vasomotrices du système nerveux sympathique présentes dans l'adventice, régulent le diamètre de la lumière des vaisseaux. Lorsque les CMLs se contractent, la lumière des vaisseaux est réduite, augmentant la pression artérielle, et inversement lorsque celles-ci se relâchent.

II.A.3 *Tunique externe (adventice)*

Des fibres de collagène composent majoritairement le feuillet le plus externe de la paroi des artères. Elles sont entrelacées et permettent l'ancrage aux structures avoisinantes. Cette couche est parcourue de neurofibres et de vaisseaux lymphatiques ainsi que de *vasa vasorum* dans les artères de très gros calibre. L'adventice joue un rôle important dans la régulation de la vasomotricité en libérant des neurotransmetteurs destinés aux CMLs.

II.B Classification des lésions

L'athérosclérose est une pathologie évolutive que l'on peut définir en différents stades. Des analyses anatomopathologiques menées dans les années 1990, réalisées par Stary et al., ont permis d'établir la première classification, décrivant 6 types de lésion (Figure 12) (Stary et al., 1995). Cette description anatomopathologique comporte 3 phases distinctes.

Les lésions précoces (stries lipidiques)

Les lésions de type I, II et III composées essentiellement de cellules spumeuses, caractéristiques de la plaque d'athérome au stade initial sont majoritairement composées de macrophages. Elles sont asymptomatiques et sont à l'origine des lésions fibrolipidiques. Ce phénomène est induit par l'oxydation des LDL dans l'espace sous-endothélial.

La plaque fibro-athéromateuse (lésions de type IV et V)

Celle-ci est composée d'un centre lipidique et nécrotique, d'une chape fibreuse constituée par des CMLs et de la matrice extracellulaire (MEC) riche en collagène et en glycoprotéines. Le centre lipidique est un mélange de cellules spumeuses, de débris cellulaires, de cristaux de cholestérol et de lipides extracellulaires. Ces plaques sont également constituées de lymphocytes T, de cellules dendritiques et de mastocytes.

La plaque compliquée

Les lésions de type VI peuvent présenter une rupture de la capsule fibreuse, des hémorragies intraplaques ou une thrombose. Elles sont majoritairement impliquées dans les SCA.

Nomenclature et histologie principale	Stades de progression	Principale mécanisme de croissance	Apparition	Corrélation clinique
Type I: Lésion initiale Macrophages isolés, spumeux		Croissance principalement par accumulation de lipides	Dès la première décennie	Asymptomatique
Type II: Stries lipidiques			Dès 30 ans	
Type III: Lésion intermédiaire				
Type IV: lésion athéromateuse Formation d'un centre lipidique sans fibrose		Augmentation du collagène et des cellules musculaires lisse	Dès 40 ans	Asymptomatique ou symptomatique
Type V: lésion fibro-athéromateuse. Avec ou sans calcification				
Type VI: lésion Compliquée		Thrombose Hématome		

Figure 12 : Classification évolutive des lésions d'athérosclérose (Schéma traduit d'après Stary et al., 1990).

Cependant, cette classification n'avait pas mis en évidence 2 étiologies des athérotromboses coronaires, distinctes des ruptures de plaque (Virmani et al., 2000), que sont l'érosion de plaque et les nodules calcifiés (Figure 13).

La fréquence des lésions responsables des thromboses coronaires a été décrite dans une récente étude publiée en 2015 par Yahagi et al., dans laquelle des analyses anatomopathologiques ont permis d'identifier les différents types de lésions responsables de mort subite chez 442 patients (Figure 14) (Yahagi et al., 2015). Les ruptures de plaque sont les plus fréquentes (65%), suivies des érosions de plaque avec 30% et des nodules calcifiés (5%). Des différences existent entre les hommes et les femmes. La prévalence de thrombose aiguë est plus importante chez les hommes que chez les femmes (53% vs 46%). Les femmes de moins de 50 ans ont une incidence d'érosion de plaque plus importante que les femmes de plus de 50 ans (84% vs 32%). En revanche, les

ruptures de plaque sont plus fréquentes chez les femmes de plus de 50 ans (53% vs 16%) (Yahagi et al., 2016).

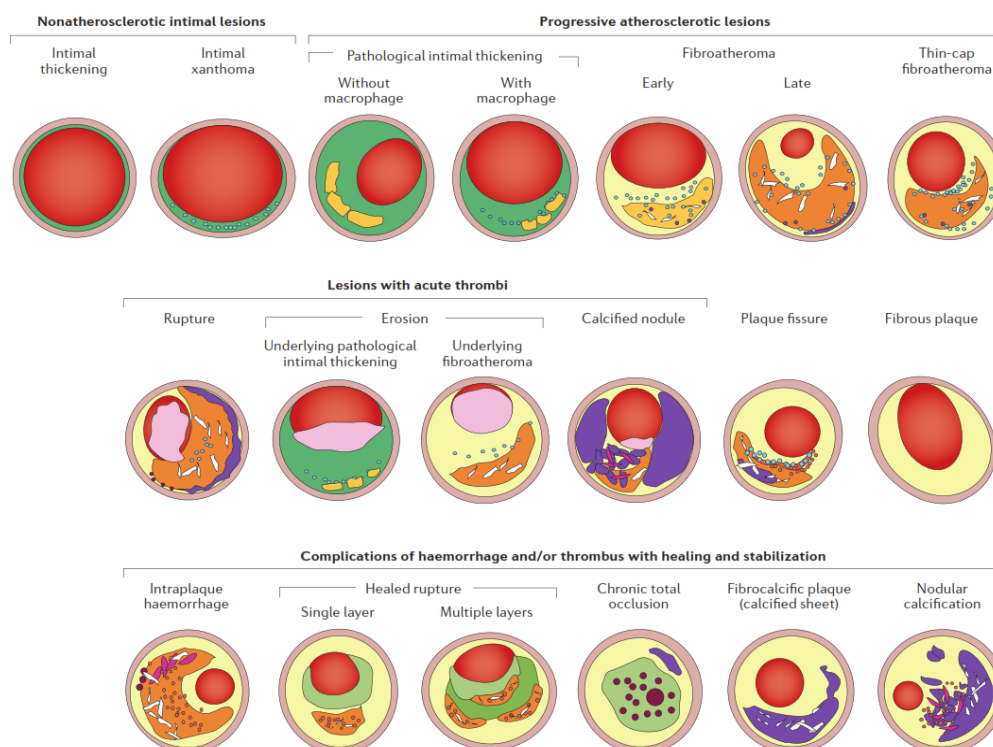


Figure 13 : Classification morphologique des lésions athéromateuses au sein d'artères coronaires humaines (Yahavi et al., 2016).

Dans une étude clinique publiée en 2013 dans le "Journal of the American College of Cardiology", Jia H et al ont évalué par "optical coherence tomography" (OCT) les types de lésions responsables des thromboses coronaires chez 126 patients avec SCA (Jia et al., 2013). *In vivo*, la prévalence des ruptures de plaque, des érosions de plaque et des nodules calciques était de 43,7 %, 31% et 7,9% respectivement.

Subpopulation	Acute thrombi (n = 236)			No acute thrombi (stable severe CAD) (n = 206)		Total
	Rupture	Erosion	Calcified nodule	Organized thrombi*	No thrombi	
Men aged <50 years	82 (48%)	34 (20%)	3 (2%)	16 (9%)	36 (21%)	171
Men aged ≥50 years	59 (31%)	14 (7%)	6 (3%)	46 (24%)	63 (34%)	188
All men	141 (39%)	48 (13%)	9 (3%)	62 (17%)	99 (28%)	359
Women aged <50 years	3 (6%)	16 (36%)	0 (0%)	4 (9%)	21 (48%)	44
Women aged ≥50 years	10 (26%)	6 (15%)	3 (8%)	8 (21%)	12 (31%)	39
All women	13 (16%)	22 (27%)	3 (4%)	12 (14%)	33 (40%)	83
Total population	154 (35%)	70 (16%)	12 (3%)	74 (17%)	132 (30%)	442

*Chronic total occlusion. Organized thrombi with healed myocardial infarction = 62/74 (84%). No thrombi (stable plaque) with healed myocardial infarction = 71/132 (54%). Abbreviation: CAD, coronary artery disease. Reprinted from Yahagi, K. et al. Sex differences in coronary artery disease: pathological observations. *Atherosclerosis* 239 (1), 260–267 © (2015), with permission from Elsevier.

Figure 14 : Distribution des lésions responsables de mort subite par âge et par sexe (Yahagi et al., 2016).

Depuis la description des mécanismes conduisant à l'IM par Fuster V et al. en 1992 dans le NEJM (Fuster et al., 1992), les contributions scientifiques dans ce domaine ont été très prolifiques et ont permis d'améliorer la prise en charge des SCA (Crea et Libby, 2017). Le chapitre suivant présente une brève revue des mécanismes moléculaires impliqués dans l'athérogenèse et ses complications.

II.C Initiation de l'athérosclérose

Cette étape se caractérise par une dysfonction endothéliale associée à l'internalisation de LDL-C dans l'espace sous-endothélial, et à leur oxydation, induisant une réponse inflammatoire dont la principale résultante est le recrutement de monocytes/macrophages dans l'intima.

II.C.1 La dysfonction endothéliale

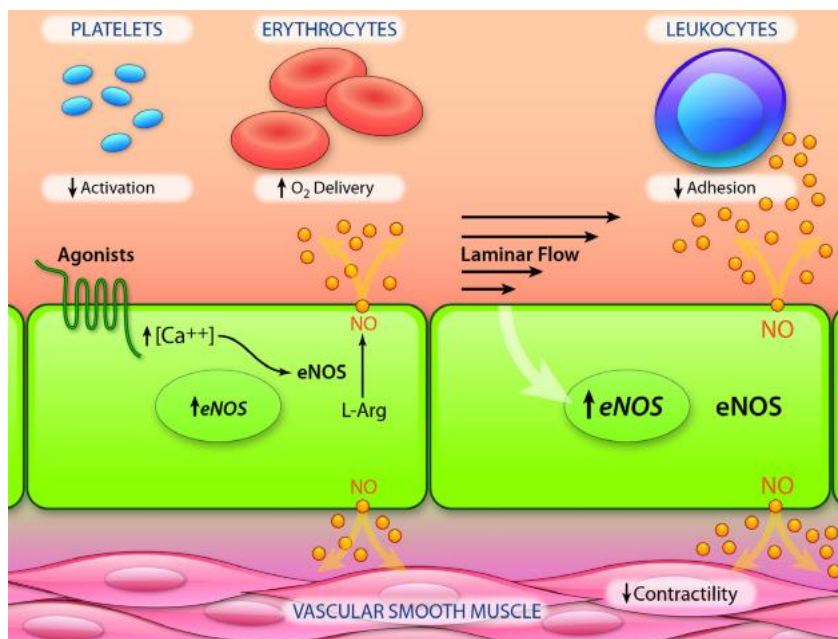


Figure 15 : Production et action biologique du monoxyde d'azote dérivé de l'endothélium vasculaire (Gimbrone et Garcia-Cardena, 2016).

L'endothélium vasculaire a pour fonction principale de servir d'interface dynamique avec le sang, et d'agir comme un intégrateur et un transducteur des stimuli mécaniques et humoraux. Il répond à ces stimuli par la synthèse et la production de molécules, selon un mode d'action paracrine et autocrine, permettant le maintien de l'homéostasie vasculaire. Par exemple, la sécrétion de monoxyde d'azote (NO), produite par la protéine NO synthase (eNOS) à partir de L-arginine et de L-citrulline au sein des cellules endothéliales, contribue au maintien du tonus vasomoteur et permet de prévenir la formation des plaques d'athérome (Figure 15). La production de NO peut être induite par l'acétylcholine, la bradykinine, mais également par des facteurs mécaniques tels que des contraintes de cisaillement constantes (Kuchan

et Frangos, 1994). Le NO diffuse rapidement au travers des cellules endothéliales et va agir par voie paracrine sur les cellules musculaires lisses, les leucocytes et les globules rouges conférant un statut anti-inflammatoire, anti-oxydant et anti-thrombotique (Cunningham et Gotlieb, 2005).

La dysfonction endothéliale est un contributeur important de la maladie coronaire et la caractéristique principale de l'initiation de l'athérosclérose. Elle correspond à une altération fonctionnelle de l'endothélium induit par différents mécanismes tels que la diminution des contraintes de cisaillement, l'inflammation et l'oxydation des LDL (Gimbrone et García-Cardena, 2016).

Contraintes de cisaillement

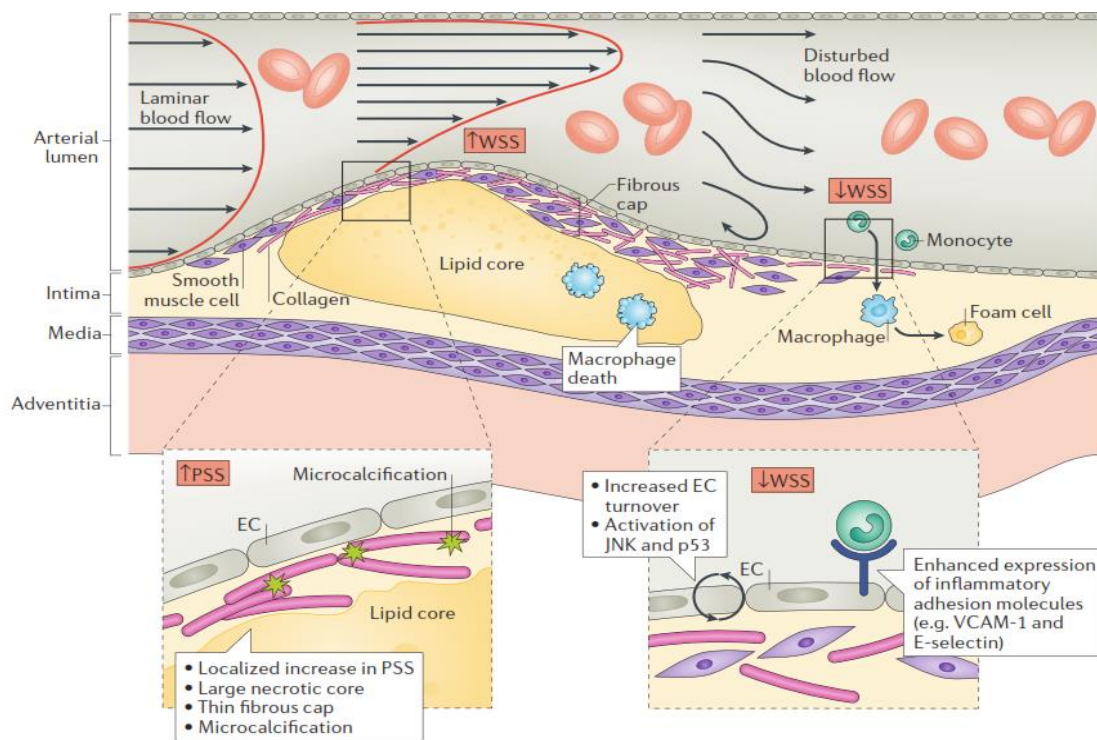


Figure 16 : Forces biomécaniques impliquées dans l'athérosclérose. L'altération des forces de cisaillement (WSS) et du stress structural de la plaque (PSS) ont des conséquences importantes sur le développement, la progression et la rupture des lésions. L'altération du flux sanguin induit par des changements géométriques de la lumière des vaisseaux résulte en une diminution des forces de cisaillement, entraînant l'expression de molécules d'adhésion cellulaire inflammatoires (VCAM-1). Au sein des lésions déjà formées, des changements subtils de la composition des plaques (microcalcification) vont augmenter le PSS, rendant ces lésions plus sujettes à la rupture. WSS=Wall shear stress, PSS= Plaque structural stress (Brown et al., 2016).

Les contraintes de cisaillement se définissent comme les forces de friction parallèles exercées par le flux sanguin sur la surface de l'endothélium vasculaire. La diminution de ces forces dans des régions précises de l'arbre artériel (bifurcation, courbure) va entraîner des modifications de la structure de l'endothélium (augmentation de la perméabilité) et de l'expression de certains

gènes (Figure 16). Cette perturbation endothéliale entraîne une diminution de la production de NO et une augmentation du stress oxydant. Les LDL oxydées et les cytokines pro-inflammatoires ont également été associées à la dysfonction endothéliale (Brown et al., 2016).

II.C.2 Les lipoprotéines

Le cholestérol plasmatique et plus précisément les LDL-C jouent un rôle prépondérant dans l'apparition et le développement des plaques d'athérome. En effet, l'internalisation et l'oxydation des LDL-C au sein de la paroi vasculaire sont les éléments initiateurs du processus inflammatoire.

II.C.2.1 Rôle des apolipoprotéines dans l'athérosclérose

II.C.2.1.1 Apolipoprotéines B (ApoB)

Les lipoprotéines retrouvées en grande majorité dans la plaque d'athérome sont composées d'apolipoprotéine B (ApoB) qui caractérise les LDL-C et dans une

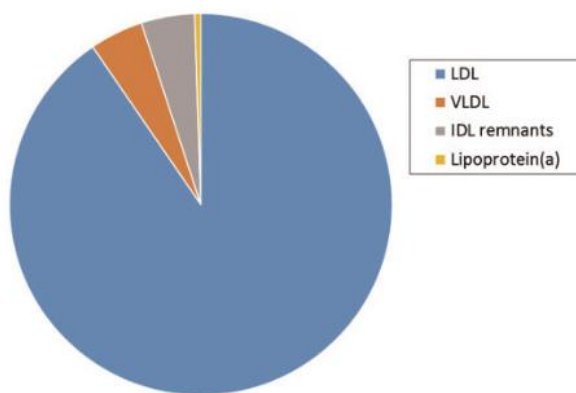


Figure 17: Concentration relative d'ApoB dans les lipoprotéines circulantes chez un individu sain (Ferenç et al., 2017).

moindre mesure les "very low-density lipoprotein" ou VLDL (Figure 17). L'apolipoprotéine B existe sous 2 isoformes, ApoB100 et ApoB48. L'ApoB100 est produite par le foie. Elle est indispensable à la synthèse et à la production des VLDL riches en triglycérides. Dans la circulation sanguine, les VLDL sont métabolisées en "intermediate low-density lipoprotein" (IDL) enrichies en esters de cholestérol et en particules de LDL suite à l'hydrolyse progressive des triglycérides par la lipoprotéine lipase (LPL) (Figure 18). L'élimination sanguine des LDL s'effectue par la fixation entre l'apoB100 exprimée par les LDL et son ligand, le récepteur hépatique aux LDL (LDLR) (Linton et al., 2000).

L'ApoB 48 est sécrétée exclusivement par l'intestin. Elle est nécessaire à la synthèse et à la production de chylomicrons riches en triglycérides, qui jouent un rôle capital dans l'absorption intestinale des lipides. Contrairement à l'ApoB100, l'ApoB48 ne se lie pas au LDLR.

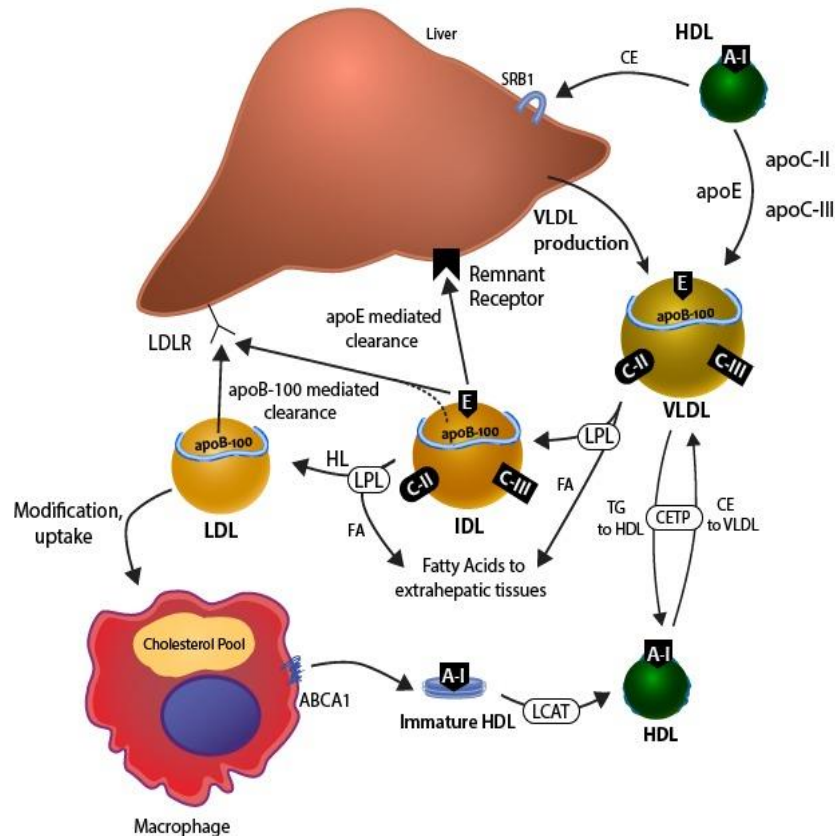


Figure 18 : Métabolisme des lipoprotéines composées d'ApoB100 (Linton et al., 2000).

II.C.2.1.2 Apolipoprotéines E

L'apolipoprotéine E (ApoE) est quant à elle indispensable à la captation et la dégradation des résidus des IDL et chylomicrons riches en triglycérides (dépourvus en ApoB) via sa forte affinité avec son ligand, le LDLR. Elle est produite en grande majorité par le foie, mais les monocytes/macrophages (circulants, extra-hépatiques) sont responsables d'environ 5 à 10% de sa production (Basu et al., 1981). Le modèle animal murin déficient pour le gène apoE (ApoE^{-/-}) présente une hypercholestérolémie responsable d'une formation spontanée de plaques d'athérome (Zhang et al., 1992). Ce modèle est utilisé dans diverses thématiques de recherche, notamment en cardiologie, pour l'étude des mécanismes physiopathologiques de l'athérosclérose ou en neurologie pour l'étude des maladies neurodégénératives (Liu et al., 2013). L'ApoE aurait des

fonctions antiathérogènes médiées par différents mécanismes, indépendants du transport des lipides. En effet, la sécrétion d'ApoE par les cellules souches hématopoïétiques (CSH) diminuerait la production et l'infiltration des monocytes au sein des lésions athéromateuses (Murphy et al., 2011).

II.C.2.2 Pénétration des LDL

Le principal mécanisme de transport des LDL au sein de l'espace sous-endothélial est la transcytose, notamment dans des régions vasculaires où le flux sanguin est perturbé (Simionescu et Simionescu, 1993). Le passage trans-endothélial des lipoprotéines est dépendant de leur concentration plasmatique, confirmant le lien entre l'hypercholestérolémie en tant que facteur de risque majeur et l'athérosclérose (Nielsen, 1996). Ces LDL-C vont pénétrer l'endothélium vasculaire dans des régions artérielles où le flux sanguin est dit turbulent, et ainsi se loger dans l'espace sous-endothélial. Ce phénomène est responsable à lui seul de l'initiation de l'athérosclérose (Williams et Tabas, 1995).

II.C.2.3 La rétention

La rétention des LDL-C dans la matrice extracellulaire de l'espace sous-endothélial est médiée par la liaison des protéoglycanes présents dans l'intima, chargés négativement sur leurs groupes sulfates, avec les résidus des ApoB chargés positivement (arginine, lysine) (Boren et al., 1998).

II.C.2.4 Oxydation

Leur oxydation est un processus complexe, induit soit par la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), soit par voie enzymatique (MPO et 12/15-lipoxygénase), ou catalysé par la présence d'ions métalliques (Parthasarathy et al., 2010).

Les LDLox vont stimuler la sécrétion par les CEs et les CMLs de chimiokines (MCP-1) et de facteurs de croissance (M-CSF) qui vont induire le recrutement des monocytes dans l'intima (Rajavashisth et al., 1990 ; Thorne et al., 1996).

II.C.3 La réponse inflammatoire

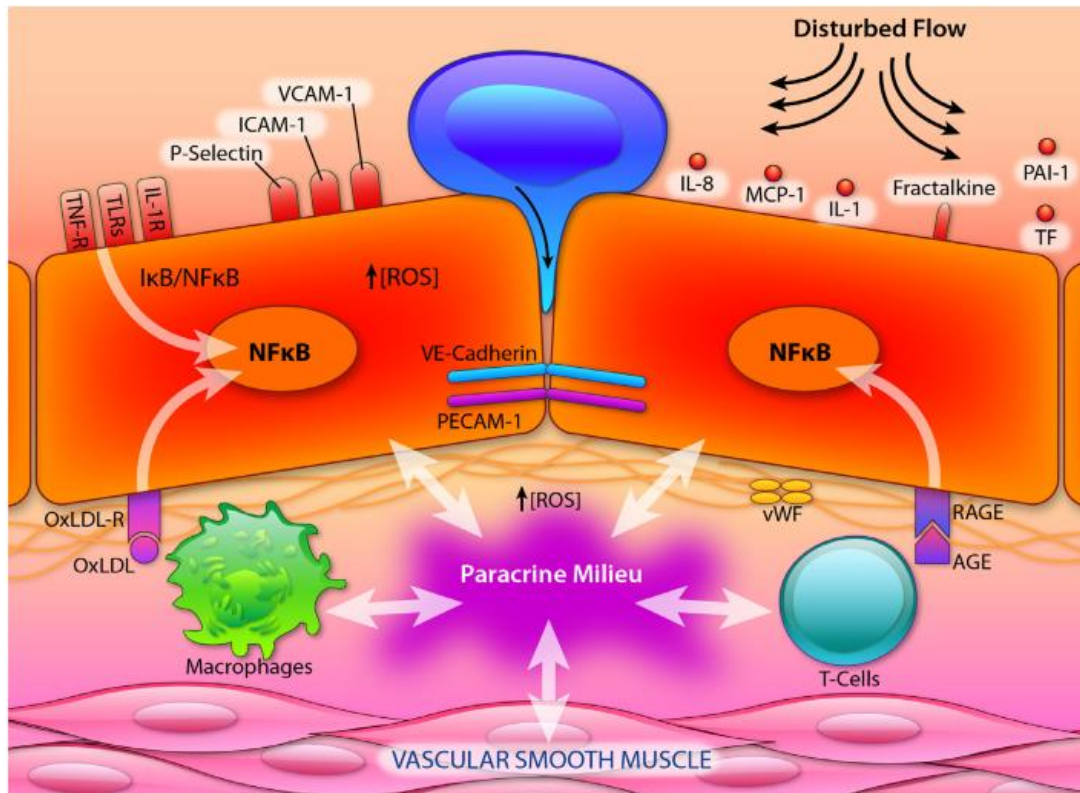


Figure 19 : Activation pro-inflammatoire de l'endothélium vasculaire. Au sein de segments vasculaires prédisposés à la formation de lésions athéromateuses, l'action de médiateurs pro-inflammatoires ($TNF-\alpha$, $IL-1$, endotoxines), de $LDLox$ et également du stress mécanique (modification des contraintes de cisaillement) vont induire l'activation de l'endothélium. Ces modifications biologiques et biomécaniques vont stimuler le facteur de transcription $NF-\kappa B$, jouant un rôle central dans la régulation de nombreux gènes pro-inflammatoires. Par exemple, une fois activé, celui-ci va induire l'expression de VCAM-1, de chimiokines (MCP-1, fractalkine) et de médiateurs prothrombotiques (facteur tissulaire, facteur de vonWillebrand et l'inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène-1) (Gimbrone et Garcia-Cardena, 2016).

Suite à leur oxydation, ces molécules vont acquérir des propriétés similaires aux "Damage Associated Molecular Patterns" (DAMPs) et déclencher ainsi une réponse inflammatoire (Glass et Witztum, 2001). Cette réponse inflammatoire se traduit par l'activation des cellules endothéliales, induisant l'entrée des monocytes dérivés de la moelle osseuse et de la rate dans l'espace sous-endothélial (Swirski et al., 2007). La captation des $LDLox$ par les macrophages va conduire à une accumulation de cholestérol au sein des macrophages, les transformant en cellules spumeuses (Figure 19).

II.C.3.1 Recrutement des leucocytes

Le recrutement des leucocytes et leur migration au sein du foyer lésionnel sont effectués par l'endothélium activé. Ce phénomène, appelé également diapédèse, est caractérisé par 3 étapes séquentielles, impliquant les sélectines, les molécules d'adhésion cellulaire et les intégrines (Figure 20) (Vestweber, 2015).

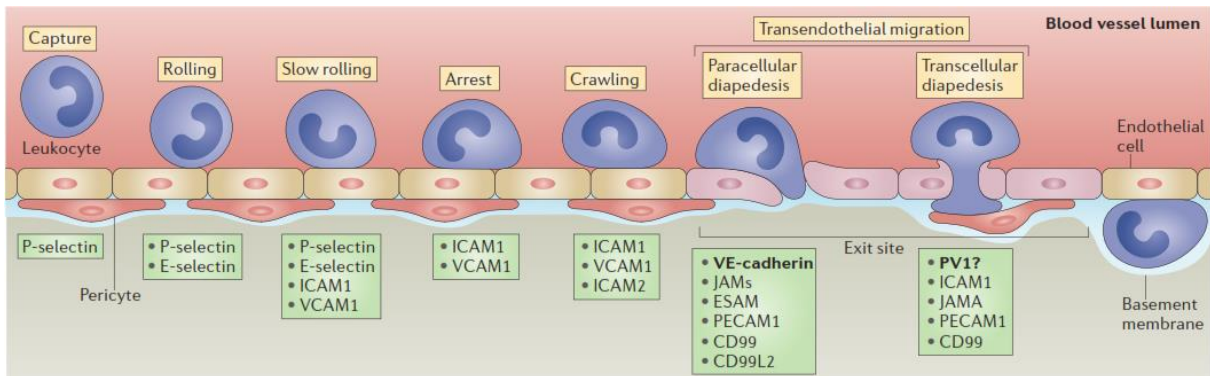


Figure 20 : Schéma présentant les différentes étapes de l'extravasation des leucocytes. La capture, le roulement, l'arrêt et la transmigration des leucocytes au travers de l'endothélium sont médiés par l'expression de divers récepteurs d'adhésion cellulaires à la surface des CEs (Vestweber, 2015).

II.C.3.1.1 Capture et roulement

Cette phase correspond à une adhésion des leucocytes, transitoire et de faible intensité, sur l'endothélium vasculaire dans le but de les ralentir. Les sélectines jouent un rôle primordial durant cette étape. Leur expression par les cellules endothéliales est induite sous l'effet de diverses cytokines pro inflammatoires telles que l'IL-1 β sécrétée par les cellules endothéliales, IL-6, et le TNF- α . Deux types de sélectines seront exprimées à la surface : la P-sélectine, qui intervient dans la capture des leucocytes et ralentit leur progression, et la E-sélectine impliquée dans le roulement faible et l'initiation de l'adhésion ferme sur les cellules endothéliales.

II.C.3.1.2 Adhésion ferme

La phase de roulement est suivie par l'adhésion ferme des leucocytes aux cellules endothéliales, via l'interaction des intégrines activées aux molécules d'adhésion cellulaires (CAM) endothéliales. L'activation rapide et transitoire des intégrines permet le contrôle local et temporel de l'attachement des cellules de l'immunité à la surface de l'endothélium.

II.C.3.1.2.1 Les molécules d'adhésion à domaine ig-CAM

Les molécules d'adhésion cellulaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig) sont des protéines transmembranaires, constituées de séries de domaines extracellulaires communs aux immunoglobulines et possédant un court domaine cytoplasmique. Les 3 principales molécules sont :

II.C.3.1.2.1.a VCAM-1

Cybulski et Gimbrone, en 1991, furent les premiers chercheurs à mettre en évidence le rôle de la molécule d'adhésion cellulaire VCAM-1, dans le recrutement des leucocytes induit par une activation de l'endothélium (Cybulsky et Gimbrone, 1991). D'autres études ont par la suite décrit le rôle de son contre-récepteur, l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire (Shih et al., 1999). Peu exprimée à l'état basal par les cellules endothéliales, VCAM-1 est induite dans les processus inflammatoires. Son rôle dans l'athérogenèse a été validé quelques années plus tard sur un modèle de souris double KO, dans lequel le domaine 4 de la protéine VCAM-1 avait été tronqué et couplé à une délétion du récepteur aux LDL. A l'aide de ce modèle, une réduction de 40% de la surface des plaques a été observée (Cybulsky et al., 2001). Chez l'homme, l'expression de VCAM-1 au sein des plaques d'athérome a été observée dans de nombreuses cellules à différents stades de développement des lésions athéromateuses (Davies et al., 1993 ; O'Brien et al., 1993). VCAM-1 est exprimée par les cellules endothéliales des néo-vaisseaux, mais également par les CMLs qui composent les lésions athéromateuses (Iiyama et al., 1999 ; Hastings et al., 2009 ; Braun et al., 1999). Dans une récente étude, le niveau d'expression de VCAM-1 a été mesuré par cytométrie en flux, sur des cellules endothéliales d'artères coronaires au niveau de plaques prélevées sous angioplastie. Une augmentation de l'expression de VCAM-1 de plus de 70% a été observée chez tous les individus ayant eu un IM (n=25) par rapport aux coronariens stables (n=47), suggérant l'intérêt de cette protéine comme marqueur pronostique dans l'évaluation du risque d'évènement cardiovasculaire récurrent (Radecke et al., 2015). Contrairement à "Intercellular cell adhesion molecule-1" (ICAM-1), VCAM-1 joue un rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose (Cybulsky et al., 2001).

II.C.3.1.2.1.b ICAM-1

Tout comme VCAM-1, ICAM-1 fait partie de la super famille des Ig-CAM. ICAM-1 est composée d'une partie extracellulaire à 5 domaines. L'interaction avec son ligand, "leukocyte function-associated antigen 1" (LFA-1), s'effectue sur le domaine 1. Elle permet l'adhésion ferme des leucocytes à la surface de l'endothélium vasculaire. En plus de son expression par les CEs, on la retrouve à la surface des leucocytes, des fibroblastes et des cellules épithéliales. Contrairement à VCAM-1, ICAM-1 permet l'adhésion ferme des neutrophiles sur la paroi endothéliale activée.

II.C.3.1.2.1.c PECAM-1

La molécule d'adhésion plaquettaire (PECAM-1 ou CD31) est constitutivement exprimée par l'endothélium. Son ligand est l'intégrine $\alpha v\beta 3$. Elle joue un rôle essentiellement dans la transmigration endothéliale des leucocytes.

II.C.3.1.3 *Transmigration endothéliale*

L'ouverture transitoire des jonctions endothéliales, notamment par la phosphorylation de la VE-cadhérine suite à la liaison des leucocytes à VCAM-1 ou à ICAM-1, est un des mécanismes participant au franchissement de la barrière endothéliale par les leucocytes. La transmigration peut se dérouler de 2 manières différentes. L'une, transcellulaire, va faire intervenir ICAM-1, la calvéoline 1 et la vimentine. La deuxième, para-cellulaire, nécessite la présence d'autres molécules d'adhésion cellulaire (PECAM1, CD99 et JAMA) (Vestweber, 2015).

II.C.3.2 Réponse immunitaire innée

Le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense de notre organisme face à des agents pathogènes. Le déclenchement d'une réponse inflammatoire par le système immunitaire inné peut être induit par deux types de signaux. Les signaux de dangers pathogéniques, appelés "Pathogen Associated Molecular Pattern" (PAMP), sont des motifs conservés, exprimés par divers pathogènes (bactéries, virus, champignons, parasites), et les signaux de dangers non pathogéniques (stériles), dénommés DAMPs, sont associés à la nécrose (Kono et Rock, 2008). Ces signaux vont être perçus par notre organisme via

l'activation de récepteurs de type PRR (Pattern Recognition Receptor) exprimés par les cellules du système immunitaire (mastocytes, cellules dendritiques, macrophages). Leur localisation est variée. Ils peuvent être intracytoplasmiques (NLR, RLR), membranaires (TLR, SC), mais également sécrétés dans le plasma (activation de la cascade du complément).

II.C.3.2.1 Les récepteurs PRR

II.C.3.2.1.1 L'inflammasome

L'inflammasome "nucleotide-binding oligomerisation domain-like receptor, pyrin domain-containing 3" (NLRP3) est un complexe multi-protéique cytosolique de signalisation permettant l'activation de la caspase-1, dont la fonction principale est le clivage (activation) protéolytique de cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β et l'IL-18. NLRP3 est présent dans la plupart des cellules myéloïdes telles que les monocytes, les neutrophiles et les éosinophiles. Il est composé d'un récepteur de type "Toll-like" (TLR), de la protéine adaptatrice ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) contenant un domaine à pyridine et une protéase à cystéine, la procaspase-1.

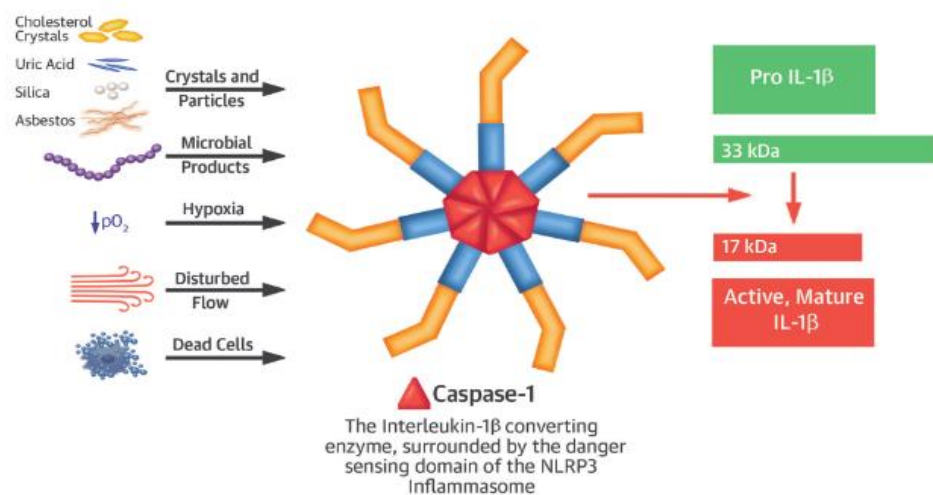


Figure 21 : La traduction du gène de l'IL-1 β produit la proIL-1 β , forme inactive de 33kDa. Ce précurseur est clivé par une enzyme, la caspase-1, pour produire la forme active de la cytokine, de 17 kDa. L'activation de la caspase-1 est sous la dépendance de l'inflammasome NLRP3. Il permet également l'activation de l'IL-18 (Libby, 2017).

L'inflammasome NLRP3 peut être activé par une multitude de stimuli (cristaux de cholestérol et d'acide urique, hypoxie, flux turbulent, ROS) et la formation nécessite 2 étapes (Figure 21). La première est l'activation du facteur de

transcription nucléaire kappa Beta (NF- κ B) par la stimulation des TLR ou par l'interaction entre les monocytes et les PNNs, entraînant une augmentation de la transcription des gènes codant pour les composants de l'inflammasome et de la pro-IL-1 β . La seconde étape est l'assemblage de l'inflammasome et l'activation de la caspase-1 (Martínez, Celermajer, et Patel, 2018). L'oligomérisation des composants de l'inflammasome suite à son activation va provoquer l'auto-activation des procaspases-1 par leur rapprochement conformationnel entraînant leur clivage auto-protéolytique.

Duewell et al. ont été les premiers à montrer l'importance de l'inflammasome NLRP3 dans le développement de l'athérosclérose (Duewell et al., 2010). Dans cette étude, des souris chimériques LDLR^{-/-} développant des lésions athéromateuses ont été transplantées avec des cellules hématopoïétiques NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} ou IL- α/β ^{-/-}. Une diminution des lésions athéromateuses a été observée chez toutes les souris transplantées avec les cellules hématopoïétiques déficientes pour l'un des composants de l'inflammasome. Dans cette même étude, la formation de cristaux de cholestérol, présents à tous les stades de développement de l'athérosclérose, a été identifiée comme le principal activateur de l'inflammasome. En effet, la phagocytose par les macrophages de ces cristaux induit une déstabilisation du phagolysosome, provoquant une rupture de leur membrane plasmique et libérant la cathepsine B, activateur de l'inflammasome. Une étude publiée la même année a confirmé les résultats de Duewell et al., ajoutant que l'activation de l'inflammasome était médiée par l'activation de la voie de signalisation du facteur de transcription "nuclear factor erythroid-2 related factor" (Nrf2), impliqué dans la production d'enzymes anti-oxydantes (Freigang et al., 2011). Les cristaux de phosphate de calcium (l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique) sont également responsables de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Chez l'homme, des études ont montré un lien étroit entre la présence de l'inflammasome NLRP3 et la vulnérabilité de la plaque (Afrasyab et al., 2016).

II.C.3.2.1.2 Récepteurs de type "Toll-like" (TLR)

Les récepteurs de type "Toll-like" font partie de la grande famille des PRRs. Environ 11 récepteurs différents ont été identifiés chez les mammifères. Ce sont des récepteurs transmembranaires de type I. Leur domaine intracellulaire est

partagé avec celui du récepteur à l'IL-1 (IL-1R). Ils peuvent être exprimés par de nombreuses cellules de l'immunité (CDs, macrophages...) et non immunitaires (CMLs, fibroblastes, CEs). On peut les retrouver soit à la surface membranaire (TLR 1, 2, 4, 5 et 6) où ils vont reconnaître les composants de la membrane microbienne, soit dans l'endosome où ils vont se lier aux acides nucléiques microbiens (TLR 3, 7, 8 et 9) (Roshan, Tambo, et Pace, 2016). Les ligands endogènes de ces récepteurs sont nombreux et variés, et incluent les composants de la matrice extra-cellulaire (MEC) (fibronectine, fibrinogène, acide hyaluronique, protéines de stress "Heat Shock Proteins" (HSP) et les LDLox). Le lipopolysaccharide (LPS), composant de la membrane externe des bactéries Gram négatif, est un inducteur puissant de l'activation du TLR4, conduisant à l'activation de NF- κ B, résultant en la production et l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α). La protéine adaptatrice MyD88 (myeloïde differentiation primary response 88) est essentielle dans la voie de signalisation de la majorité des TLRs (Falck-Hansen, Kassiteridi, et Monaco, 2013).

L'expression de ces récepteurs, notamment TLR4 et TLR2, est étroitement liée à la progression de l'athérosclérose. Par exemple, l'activation de TLR2 est impliquée dans la migration des CMLs de la média vers l'intima, sous l'induction de l'IL-6 (Lee et al., 2012). Il a également été observé une surexpression de ce récepteur à la surface des CEs, dans les zones prédisposées au développement des lésions athéromateuses (Mullick et al., 2008).

Une délétion du gène codant pour le TLR 4 a été associée à une diminution du développement des lésions athéromateuses chez les souris ApoE^{-/-}, conjointement à une diminution de l'infiltration des monocytes (Michelsen et al., 2004). La reconnaissance des LDLox par les TLR4 et 6 en partenariat avec le "scavenger receptor" (SR) CD36 a également été associée à l'activation de NF- κ B, démontrant la sensibilité des TLRs à des stimuli pro-athérogènes (voir Figure 26) (Stewart et al., 2010).

II.C.3.2.1.3 Les "Scavenger Receptors" (SR)

Ces récepteurs transmembranaires sont retrouvés pour la plupart d'entre eux à la surface membranaire des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules endothéliales. Il existe 8 classes différentes de SR. Découverts pour la première fois par Brown et Goldenstein en 1979, ces récepteurs ont été identifiés

par leur capacité à se lier aux LDLox et non aux LDL natifs (Goldstein et al., 1979). Parmi les récepteurs internalisant les LDLox, on retrouve le SR-A1, CD36 (SR-B3), "Lectin-like oxLDL Receptor-1" (LOX-1), SR-B1 et SR-B2 (Figure 26). En fonction du récepteur activé, les mécanismes d'endocytose par les macrophages des LDLox sont différents (cavéoles, raft lipidique ou puits à clathrine) et résultent dans la formation de cellules spumeuses (Zani et al., 2015). En plus de promouvoir l'absorption des lipides, les SR semblent agir sur la progression de l'athérosclérose via l'activation de voies de signalisation spécifiques (JNK2) (Ricci et al., 2004).

II.C.3.2.2 *Les cytokines*

Les cytokines font partie d'un groupe de glycoprotéines à faible poids moléculaire. Il en existe une centaine et elles ont été classées en différentes catégories suivant leur structure : les interleukines, les chimiokines, les "colony-stimulating factors" (CSF), les "tumor necrosis factors" (TNF), les interférons (IFN) et les "transforming growth factors" (TGF). Ce sont des médiateurs de l'inflammation dont le rôle peut être pro ou anti-inflammatoire.

II.C.3.2.2.1 *Les cytokines pro-inflammatoires*

Au stade précoce de l'athérosclérose, les cytokines vont induire l'expression de chimiokines et de molécules d'adhésion cellulaire, favorisant la transmigration des monocytes dans l'espace sous-endothélial. La différenciation des monocytes en macrophages, en présence de facteurs de croissance tels que le "macrophage colony-stimulating factor" (M-CSF), va entraîner la phagocytose des LDLox par les macrophages, transformant ces cellules en cellules spumeuses. La production de cytokines pro-inflammatoires peut aboutir à la déstabilisation de la plaque médiée par leur action sur l'apoptose cellulaire et la dégradation de la MEC (Ait-Oufella et al., 2011).

II.C.3.2.2.1.a *Les interleukines*

Ces cytokines, au nombre de 11 protéines, partagent de nombreuses homologies de séquence entre elles. Elles comptent parmi elles l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-18 (Figure 22).

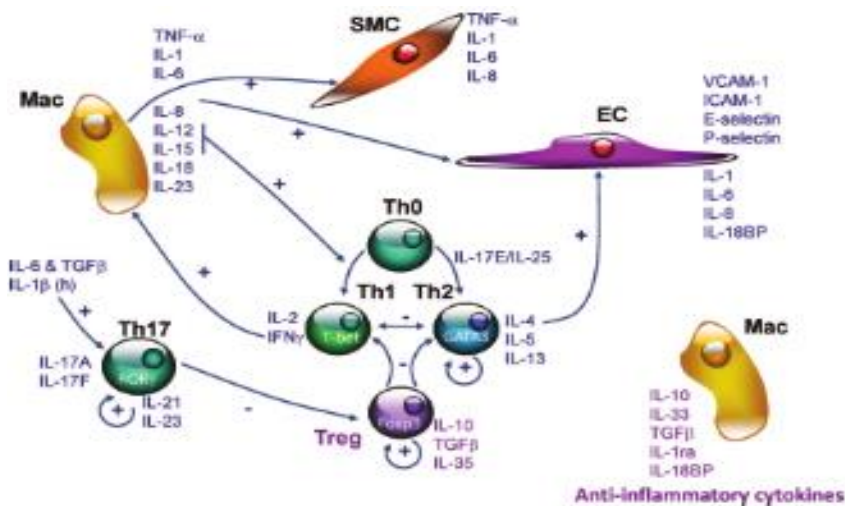


Figure 22 : Cellules impliquées dans la production de cytokines pro-inflammatoires. L'IL-12 et l'IL-18 sont des inducteurs de l'IFN- γ , impliqué dans la différenciation des LT naïfs en LTh1 pro-athérogènes. Les cytokines dérivées des macrophages activent la production par les CEs et les CMLs de nombreux médiateurs pro-inflammatoires. D'autre part, les cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10 et le TGF- β , également sécrétées par les macrophages, stimulent la prolifération de LTreg, anti-athérogènes (Ait-Oufella et al., 2011).

Il.C.3.2.2.1.a.i IL-1 α et β

De nombreux modèles de délétion de gènes pour l'une de ces 2 cytokines ont confirmé leurs propriétés pro-athérogènes (Kirij, 2003).

L'IL-1 β est synthétisée sous forme de précurseur, la pro-IL-1 β . La forme active est sécrétée par les cellules hématopoïétiques suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Libby P, 2017). Dans une moindre mesure, les "neutrophils extracellular traps" (NETs) peuvent également cliver la pro-IL-1 β . L'IL-1 β se fixe à son récepteur IL-1R, formant un hétérodimère activant des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'activation du facteur de transcription NF- κ B. L'IL-1 β stimule l'expression des CAMs (VCAM-1, ICAM-1) et induit l'expression de chimiokines (MCP-1) (Figure 23).

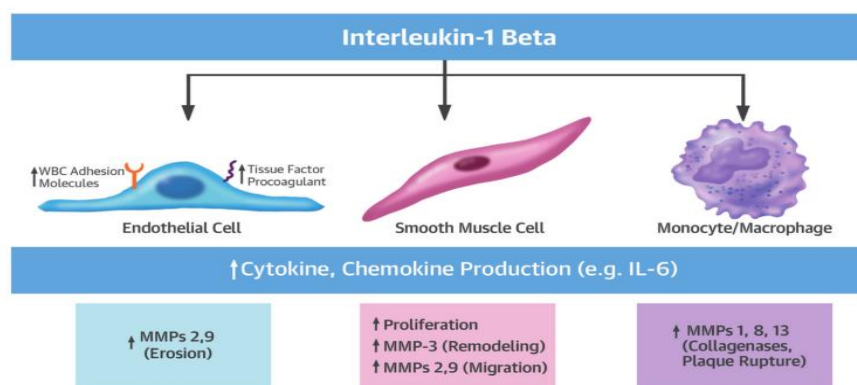


Figure 23 : L'IL-1 β agit sur de nombreuses cellules qui participent à la progression de l'athérosclérose, comme les CEs, les CMLs, et les monocytes/macrophages, induisant la sécrétion de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (Libby, 2017).

Au sein des CMLs et des CEs, l'IL-1 β peut induire sa propre production (auto-induction).

II.C.3.2.2.1.a.ii IL-18

Comme pour l'IL-1, l'activation de l'IL-18 résulte du clivage par la caspase-1 de son précurseur, la pro-IL-18. Cytokine pro-inflammatoire dont l'expression est augmentée au sein des lésions athéromateuses, il semblerait que son effet pro-athérogène soit médié par l'IFN- γ . L'absence de son récepteur conduit à une diminution d'IFN γ par les "natural killers" (NKs), altérant la voie de signalisation des LTh1 et leur différenciation (Hoshino et al., 1999). Son expression serait associée à l'instabilité des plaques chez l'homme (Mallat et al., 2001).

II.C.3.2.2.1.a.iii IL-6

L'IL-6 est une cytokine possédant des propriétés originales, puisqu'elle a été associée à des effets pro- et anti-inflammatoires en fonction du type de lésion et des cellules impliquées dans la réponse.

L'IL-6 est le principal inducteur de la synthèse protéique aiguë par les hépatocytes. Elle induit entre autres la production de CRP, biomarqueur de l'inflammation.

L'IL-6 possède des effets pro-athérogènes médiés par l'activation de l'endothélium vasculaire et par la stimulation de la prolifération des CMLs (Reiss, 2017). L'IL-6 est également impliquée dans l'activation des LT en LT cytotoxiques.

En dépit de ses effets pro-athérogènes sur les cellules impliquées dans l'athérosclérose, l'IL-6 présenterait des propriétés anti-athérogènes médiées par l'augmentation de l'expression de l'"ATP-binding cassette transporter" A1 (ABCA1) et l'inhibition de l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires, notamment par la production d'IL-1ra (antagoniste du récepteur à l'IL-1).

II.C.3.2.2.1.a.iv IL-17

Elle fait partie de la famille de cytokines découvertes le plus récemment (Butcher et al., 2012). L'IL-17 est sécrétée par les LT_H17 activés et stimule la production de facteurs pro-inflammatoires (IL-6, CXCL8 et G-CSF).

II.C.3.2.2.1.b L'interféron gamma

L'IFN- γ est une cytokine produite par les LTh1, les LT CD8+, et les macrophages. Elle permet l'activation des CD4, des NKs et des monocytes/macrophages. C'est une cytokine clé de l'athérosclérose. De nombreuses études ont montré une concentration élevée de cette cytokine au sein des lésions athéromateuses chez des modèles murins et chez l'homme (Zhou et al., 1998 ; Hansson, Holm, et Jonasson, 1989). Sa sécrétion par les CEs induit l'expression de nombreuses CAMs dont VCAM-1 (Zhang et al., 2011). La délétion de son récepteur chez un modèle de souris ApoE^{-/-} entraîne une diminution de la formation des lésions athéromateuses et une augmentation de leur contenu en collagène (Gupta et al., 1997).

II.C.3.2.2.1.c Le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)

Le TNF- α est une cytokine homotrimérique qui se lie à deux récepteurs que sont TNFR1 et TNFR2. Il fait partie des médiateurs clés de la réponse inflammatoire, régulant l'activation des leucocytes, leur maturation, la libération de chimiokines et l'expression de leur récepteur, ainsi que la production de ROS (McKellar et al., 2009). Des études expérimentales ont montré chez la souris le rôle primordial du TNF- α dans l'athérosclérose. La délétion de son gène chez un modèle de souris ApoE^{-/-} induit une diminution des lésions athéromateuses, accompagnée d'une diminution de l'expression de certaines CAMs (ICAM-1 et VCAM-1) et de MCP-1 (Ohta et al., 2005).

II.C.3.2.2.1.d Les Colony Stimulating Factor (CSF)

II.C.3.2.2.1.d.i Granulocyte/Monocyte-CSF (GM-CSF)

GM-CSF induit la différenciation des monocytes et des cellules hématopoïétiques en CD4 (Ait-Oufella et al., 2011). Les LDLox induisent son expression par les CEs. Shaposhnik et al. ont mis en évidence l'importance du facteur de croissance GM-CSF dans la prolifération des CD4 au sein des lésions athéromateuses. La délétion de GM-CSF, chez un modèle de souris LDLR^{-/-}, a entraîné une réduction de la surface des plaques comprise entre 20 et 50% en comparaison de souris LDLR^{-/-}, sans modification du nombre de CD4 circulantes (Shaposhnik et al.,

2007). GM-CSF a également été retrouvé au sein des plaques d'athérome humaines avancées, sujettes à rupture (Sugiyama et al., 2001).

II.C.3.2.2.1.d.ii *Monocyte-CSF (M-CSF)*

M-CSF est un facteur de prolifération et de différenciation des cellules souches hématopoïétiques en monocytes. Au sein des lésions athéromateuses, ce facteur est synthétisé par les CEs et les CMLs. Son action pro-athérogène a été observée pour la première fois en 1995, par Smith JD et al. (Smith et al., 1995), chez un modèle de souris double mutant pour les gènes ApoE et *op* (ostéopétrotique) présentant une monocytopenie et une déficience en M-CSF (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990). Ces résultats ont été confirmés quelques années plus tard sur des souris LDLR^{-/-} *op/op* (Rajavashisth et al., 1998). Chez l'homme, des taux plus élevés de M-CSF circulants ont été retrouvés chez des patients présentant un SCA récent en comparaison de coronariens stables (Saitoh et al., 2000).

II.C.3.2.2.2 *Les cytokines anti-inflammatoires*

II.C.3.2.2.2.a IL-10

L'IL-10 est sécrétée par les macrophages (M2) et certains lymphocytes (LTreg). Son action est principalement anti-inflammatoire. Chez des modèles de souris développant spontanément des plaques, la délétion de l'IL-10 a induit une augmentation de l'infiltration des monocytes et de la production de cytokines pro-inflammatoires (Mallat et al., 1999).

II.C.3.2.2.2.b Famille de l'IL-1

L'IL-1R α , l'IL-33 et l'IL-37 sont des cytokines anti-inflammatoires faisant partie de la famille de l'IL-1. Des modèles de délétion de l'IL-1R α et l'IL-33 ont mis en évidence leurs effets anti-athérogènes chez la souris (Miller et al., 2008).

II.C.3.2.2.2.c Transformation Growth Factor β (TGF- β)

Le TGF- β inhibe la prolifération, l'activation et la différenciation des LT. Des études menées chez la souris ont mis en évidence le rôle anti-athérogène de cette cytokine chez un modèle de souris ApoE^{-/-} (Gojova et al., 2003). Ces

résultats ont été confirmés par l'équipe de Ait-Oufella en 2006 chez un modèle de souris ApoE^{-/-} (Ait-Oufella et al., 2006).

II.C.3.2.2.2.d IL-35

Récemment identifiée, cette cytokine aurait des effets immunosuppresseurs/anti-inflammatoires (Li et al., 2012). C'est une cytokine dimérique composée de 2 sous-unités. Elle est sécrétée par les LTreg, certains sous-types de LB, par les CD4 et dans une moindre mesure par les CEs, les monocytes et les CMLs (Shen et al., 2014). Contrairement au TGF- β , son expression n'est pas constitutive, elle est induite par des stimuli pro-inflammatoires. L'inhibition de la génération mitochondriale de ROS entrainerait une suppression de l'activation endothéliale, principal mécanisme responsable de l'effet anti-athérogène de l'IL-35 (Li et al., 2018).

II.C.3.2.2.3 Les chimiokines et leurs récepteurs

L'infiltration de la paroi artérielle par les monocytes, neutrophiles et autres cellules de l'immunité est l'un des marqueurs de l'athérosclérose. Ce recrutement est gouverné par l'expression de molécules d'adhérence cellulaire conjointement aux chimiokines et à l'expression de leurs récepteurs suivant un gradient de concentration (chimiotaxie). Les chimiokines sont des petites cytokines (≈ 10 kDa), divisées en sous-groupes, en fonction de la position de leurs résidus cystéine à l'extrémité N-terminale (CC, CXC, CX₃C, XC). Elles sont exprimées par différents types cellulaires tels que les CEs activées, les CMLs et les leucocytes. Leurs récepteurs appartiennent à la classe des récepteurs couplés aux protéines G et sont classés en fonction de la nature de leur ligand (Zernecke et Weber, 2014).

Durant la phase initiale de l'athérosclérose, la sécrétion de CXCL1 par les CEs activées contribue à la mobilisation des monocytes (LyC6^{hi}), mais également des neutrophiles, au travers de l'activation du récepteur CXCR2 (Zhou et al., 1998). La sécrétion de CCL20 et l'activation de son récepteur CCR6c exprimé par les monocytes seraient également importants pour la mobilisation et le recrutement des monocytes dans l'athérogenèse (Wan et al., 2011). Le rôle important de "monocyte chemoattractant protein-1" (MCP-1 ou CCL2) dans l'initiation de

l'athérosclérose a été démontré pour la première fois en 1998 par l'équipe de Rollins B. Les auteurs de cette étude ont observé une réduction de 81% du contenu en lipides des lésions athéromateuses chez un modèle de souris double KO pour les gènes du LDLR et de MCP-1 en comparaison du groupe contrôle LDLR^{-/-} (Gu et al., 1998). Chez l'homme, l'expression de cette chimiokine est augmentée au sein des lésions athéromateuses (Ylä-Herttuala et al., 1991). Plus généralement, les chimiokines et les récepteurs nécessaires à la migration des monocytes sont CCR2/CCL2 (MCP-1), CX3CR1/CX3CL1 et CCR5/CCL5 (RANTES) (Combadiere et al., 2008) (Figure 24).

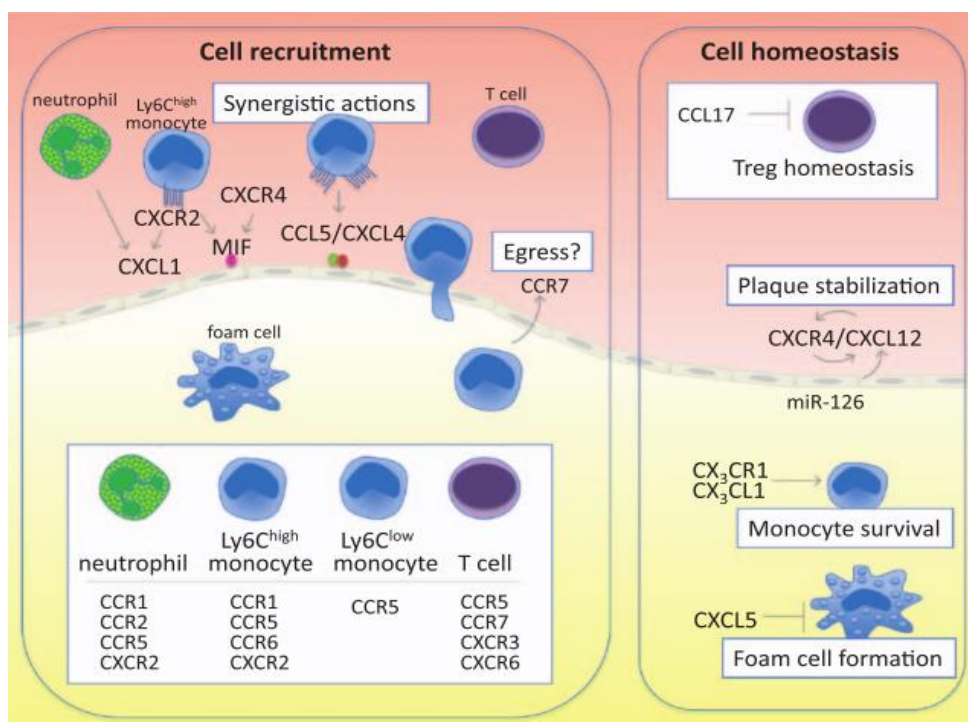


Figure 24 : Diversité fonctionnelle des chimiokines dans l'athérosclérose. Les chimiokines attirent les leucocytes au site lésionnel, par l'activation de leur récepteur. L'acide lysophosphatidique, un composant des LDL, va stimuler la sécrétion par les CE de CXCL1 dans le but de mobiliser et de recruter des monocytes et des neutrophiles par l'intermédiaire de leur récepteur CXCR2 (Zernecke et Weber, 2014). CCR7 pourrait favoriser la sortie de macrophages sous certaines conditions. "Migration inhibitory factor" (MIF) interagit directement avec CXCR2 et CXCR4. Au-delà de leur fonction dans le recrutement, CCL17 inhibe la régulation des LTreg, favorisant l'athérosclérose. CCL12 peut être induit par le miR-126 des CE et s'engage dans une boucle de rétrocontrôle amplificatrice pour stabiliser les lésions (Zernecke et Weber, 2014).

II.C.3.2.3 Les cellules de l'immunité innée

II.C.3.2.3.1 Monocytes/Macrophages

En réponse à une infection ou une lésion, les monocytes infiltrent les tissus lésés et se différencient en macrophages, en cellules dendritiques ou autres types cellulaires.

Les monocytes sont originaires de la prolifération et de la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la moelle osseuse. Les précurseurs des CSH (PCSH) résident au sein de niches composées de nombreux types cellulaires (CEs, fibroblastes, ostéoclastes, cellules souches mésenchymateuses...) possédant des fonctions variées (Swirski, Hilgendorf, et Robbins, 2014). Par exemple, l'expression de CXCL12 (stromal cell derived factor-1) par les CEs et les ostéoclastes permet en partie la rétention des CSH via l'activation de leur récepteur CXCR4, comme également l'expression de VCAM-1 (Figure 25). La différenciation séquentielle de cellules pluripotentes en des cellules différenciées implique le passage par différentes populations

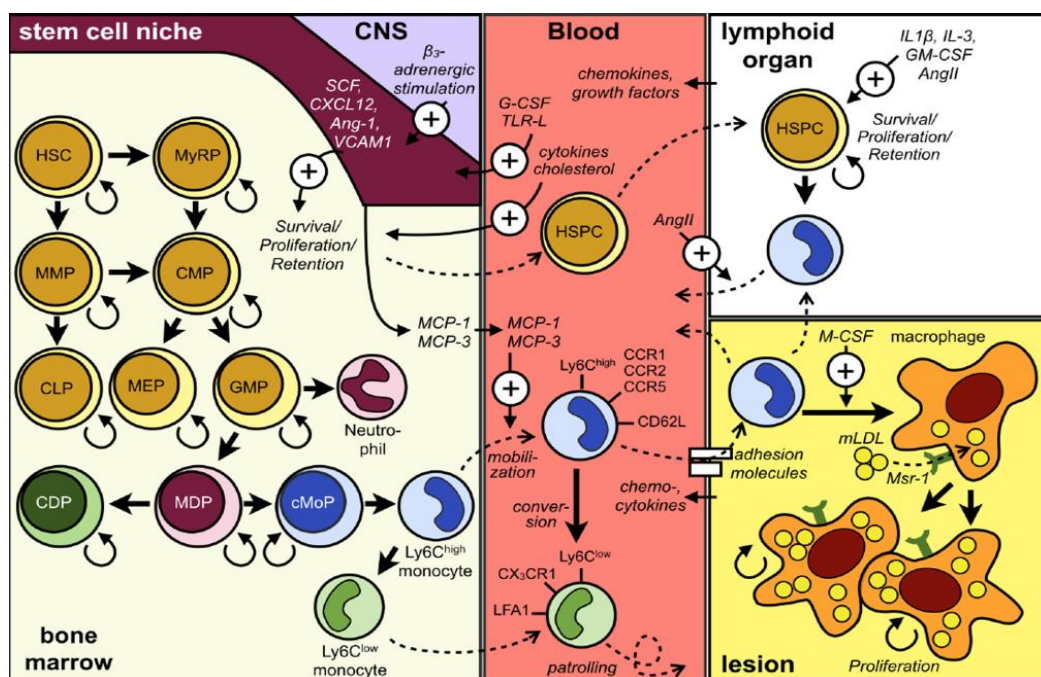


Figure 25 : La relation topo-ontogénique de la lignée monocytaire. Description du développement des monocytes au sein de la moelle osseuse et de leurs précurseurs dans les sites d'hématopoïèses extra-médullaires, de leur passage dans la circulation sanguine, et de leur différenciation et prolifération dans les tissus périphériques (Swirski, Hilgendorf, et Robbins, 2014).

intermédiaires caractérisées par l'expression de multiples marqueurs (CD115, CD34...). Leur prolifération et leur différenciation sont médiées par des facteurs intrinsèques (facteurs de transcription) et des facteurs environnementaux, extrinsèques (facteurs de croissance). Parmi les nombreux facteurs de transcription, "PU box finding factor 1" (PU.1) est le régulateur clé de la différenciation des cellules lymphoïdes et myéloïdes. Les M-CSF, G-CSF, GM-CSF et l'IL-3 font partie des facteurs de croissance régulant la différenciation et la prolifération des granulocytes/macrophages. La moelle osseuse n'est pas le seul site de prolifération et différenciation des PCSH. Au cours de maladies inflammatoires chroniques (athérosclérose, cancer) et aiguës (IMA),

l'augmentation des PCSH, dont la production et la différenciation sont sous le contrôle de facteurs de croissance tels que le GM-CSF et l'IL-3, va entraîner la formation de niches extra-médullaires (rate) (Robbins et al., 2012).

De nombreuses études ont identifié un lien étroit entre l'athérosclérose et l'augmentation de sous-populations de monocytes CD14⁺⁺ chez l'homme et Ly6C^{hi} chez la souris. L'un des mécanismes responsables de cette monocytose serait lié à l'hypercholestérolémie. Il a en effet été observé dans une étude menée chez des souris ApoE^{-/-} sous régime hypercholestérolémiant, une augmentation de plus de 14 fois du nombre de monocytes Lys-6C^{hi} en comparaison à des souris ApoE^{-/-} sous régime standard (Swirski et al., 2007). Ce mécanisme serait lié à l'accumulation de cholestérol dans la membrane des CSHP qui augmenterait l'expression de la sous-unité β du récepteur à l'IL-3/GM-CSF, augmentant la réponse proliférative induite par l'IL-3 et GM-CSF (Yvan-Charvet et al., 2010 ; Murphy et al., 2011).

La réponse inflammatoire induite par les DAMPS va promouvoir l'entrée des monocytes (Ly-6C^{hi}) originaires de la moelle osseuse et de la rate (hématopoïèse extra-médullaire) par la sécrétion de cytokines via les CEs, les macrophages de l'intima et les CMLs (Zimmer, Grebe, et Latz, 2015). Sous l'effet du facteur de croissance M-CSF, sécrété par les CEs activées et les CMLs, les monocytes vont se différencier en macrophages (Clinton et al., 1992).

L'hétérogénéité des macrophages au sein des plaques leur confère des rôles différents dans l'athérogenèse, allant de "macrophages pro-inflammatoires" aux "macrophages de cicatrisation". Ces macrophages ont été groupés selon le paradigme M1-M2. Les macrophages M1 classiques, pro-inflammatoires, sont responsables de la progression de l'athérosclérose, alors que les macrophages alternatifs, M2 de cicatrisation, sont impliqués dans le processus de réparation tissulaire (Sica et Mantovani, 2012). Par la sécrétion de cytokines, de protéases et d'autres facteurs, les macrophages inflammatoires vont augmenter l'expansion cellulaire des lésions athéromateuses, entraînant des changements morphologiques (nécrose et amincissement de la chape fibreuse) pouvant aboutir à la rupture de plaque et à un évènement athérothrombotique. En revanche, les macrophages anti-inflammatoires M2 favorisent la stabilisation de la plaque par l'élimination des cellules apoptotiques (efférocytose), la sécrétion de collagène et de protéines anti-inflammatoires. La dichotomie entre macrophages M1 pro-

inflammatoires et M2 anti-inflammatoires a été remise en question dans de récentes études qui décrivent un rôle plus nuancé de ces cellules dans l'athérosclérose (Murray et al., 2014).

De récentes études utilisant des souris parabiotiques ont montré que l'origine des macrophages présents au sein des lésions naissantes repose de manière prédominante sur la différenciation de monocytes circulants, contrairement aux lésions avancées où la prolifération locale des macrophages devient le mécanisme majoritaire (Robbins et al., 2013). La prolifération des macrophages ne serait pas restreinte aux seuls macrophages présents dans l'intima (Cybulsky, Cheong, et Robbins, 2016). Les macrophages résidents dans l'adventice depuis l'embryogenèse vont également se diviser durant l'athérosclérose, mais la compréhension de leur contribution dans le développement de l'athérosclérose nécessite des études plus approfondies (Swirski, Robbins, et Nahrendorf, 2016).

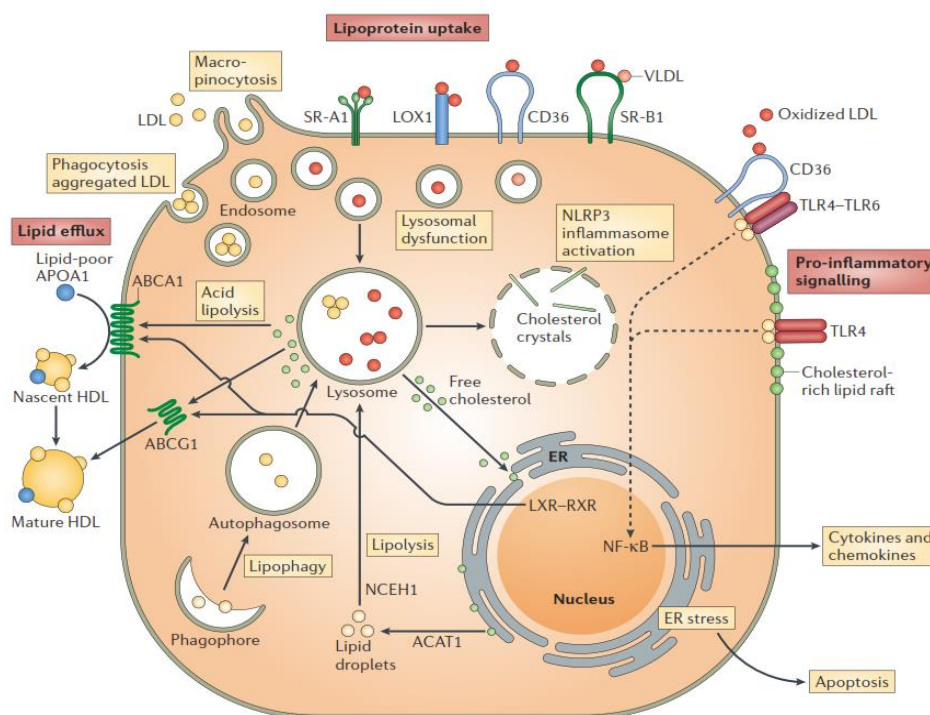


Figure 26 : Mécanismes de régulation du cholestérol dans les macrophages (Moore, Sheedy, et Fisher, 2013).

Les macrophages peuvent internaliser les LDL, les VLDL et les LDLox par différents mécanismes comme la macropinocytose, la phagocytose des agrégats de LDL, et par les SRs (Figure 26). La digestion des lipides est effectuée au sein des lysosomes, résultant en la libération de cholestérol libre qui peut être exposé soit à la membrane plasmique pour être éliminé, soit à la membrane du

réticulum endoplasmique (RE). L'accumulation de cholestérol active le facteur de transcription hétérodimérique "liver X receptor (LXR)-retinoid X receptor" (LXR-RXR) qui régule l'expression de récepteurs impliqués dans le transport inverse du cholestérol, que sont "ATP binding cassette" A1 (ABCA1) et G1 (ABCG1). Ils permettent la formation de HDL naissants à partir d'ApoA1 et de cholestérol libre. Les HDL matures sont composés de cholestérol estérifié présent au centre des particules. L'excès de particules de cholestérol libre au sein des lysosomes peut aboutir à la formation de cristaux de cholestérol, principal inducteur de l'activation de l'inflammasome NLRP3. L'excès de cholestérol libre peut également être responsable d'un stress du RE, qui prolongé, entraîne l'apoptose des macrophages (Moore, Sheedy, et Fisher, 2013).

II.C.3.2.3.2 *Les polynucléaires neutrophiles (PNN)*

Les PNN sont des cellules clés de la réponse immunitaire innée. Elles vont répondre à la présence d'agents infectieux par la production de pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs). Les neutrophiles contiennent de nombreuses vacuoles bactéricides et digestives composées notamment de myéloperoxydases (MPO) et de métalloprotéinases (MMP). Leur production est régulée par le G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), tandis que leur rétention médullaire est contrôlée par les CXCR2 et CXCR4 (Martin et al., 2003).

De nombreuses études suggèrent que les neutrophiles pourraient jouer un rôle important dans l'initiation, la progression et la vulnérabilité de la plaque (Hartwig et al., 2015). Leur recrutement au sein des lésions athéromateuses est régulé par de nombreuses cytokines et CAMs, dont ICAM-1 et les sélectines P et E. La libération par les plaquettes de CCL5 (RANTES) induit la migration des neutrophiles par l'activation de ses récepteurs CCR1 et CCR5 (Huo et al., 2003). Leur présence dans l'espace sous-endothélial va induire une augmentation de la production de ROS au travers de la libération de MPO, NADPH oxydases et lipooxygénases, résultant en une augmentation de LDLox et en la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par les macrophages. Les neutrophiles sont également présents dans les plaques avancées, associés à des phénotypes de plaques vulnérables, suggérant leur rôle dans la déstabilisation (Ionita et al., 2010). En effet, les PNN sont une source importante de métalloprotéases (MMP-9, MMP-8 et MMP-13) dont le rôle dans la dégradation de la MEC et la

déstabilisation des plaques est bien connu (Newby, 2016). Les neutrophiles jouent également un rôle important dans les érosions de plaque (voir chapitre érosion de plaque).

II.C.3.2.3.3 Les "natural killers" (NK)

Les cellules NK ont été décrites à l'origine comme étant des lymphocytes de l'immunité innée capables d'induire l'apoptose (lyse) par la libération de granules (perforine et granzyme B) et/ou de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ . L'action pro-athérogène des NK, décrite dans de nombreuses études menées chez la souris, serait essentiellement médiée par leur action cytotoxique (granzyme B et perforine) (Selathurai et al., 2014). Ces cellules ont également été identifiées au sein des lésions humaines (Jonasson et al., 1986). Néanmoins, leur mécanisme d'action au sein des lésions athéromateuses est encore peu décrit.

II.C.3.2.3.4 Les mastocytes

Les mastocytes prennent naissance à partir de précurseurs de la moelle osseuse et sont activés par liaison aux récepteurs des membres de la famille des IgE ou d'autres molécules telles que les TLRs, les cytokines et d'autres antigènes. Ce sont des médiateurs participant à la réponse immunitaire innée et adaptative, par la sécrétion de substances vasoactives, de chimiokines, et de molécules pro-inflammatoires.

L'augmentation des mastocytes a été associée au développement de l'athérosclérose (Kartinen, Penttila, et Kovanen, 1994). Les mastocytes exprimant les récepteurs aux chimiokines CCR2, CCR3 et CCR5 se lient respectivement à MCP-1, l'éotaxine (MCP-3) et RANTES (CCL5), entraînant leur migration au sein de l'espace sous-endothélial (Conti et al., 2017). Ces cellules sont à la fois impliquées dans l'initiation de l'athérosclérose par la sécrétion de molécules associées au recrutement de leucocytes (CCL2, TNF- α , IL-6), mais également dans les plaques avancées, où elles vont contribuer à leur déstabilisation par la libération de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, basic fibroblast growth factor) et de protéases dégradant la MEC (tryptase, chymase) (Bot, Shi, et Kovanen, 2015).

II.C.3.2.3.5 Les cellules dendritiques (CDs)

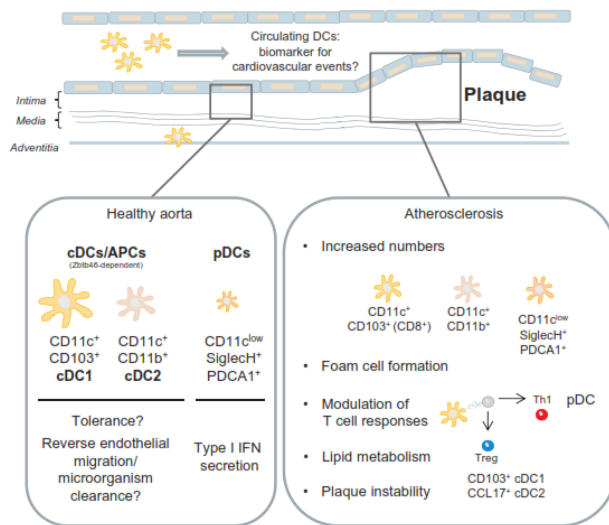


Figure 27: Cellules dendritiques au sein d'une aorte saine ou présentant une lésion athéromateuse. Durant l'athérosclérose, les CDs vont promouvoir le développement des plaques par l'activation des LT, et leur action inhibitrice de la prolifération des LTreg (Gil-Pulido et Zerneck, 2017).

Les cellules dendritiques font partie de la famille des cellules présentatrices d'antigènes (APC) qui possèdent à leur surface membranaire de nombreuses molécules du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMHII). Elles permettent de faire le lien entre l'immunité innée et adaptative, en présentant les antigènes aux LT. Une fois activées, les CDs migrent vers les ganglions lymphatiques afin

de présenter les antigènes aux LT et vont sécréter de nombreuses cytokines (Cybulsky, Cheong, et Robbins, 2016). Générées à partir des précurseurs des CDs (CDP), les CDs se différencient en CD plasmacytoïdes (pCD) dans la moelle osseuse, ou donnent naissance en quittant celle-ci aux pré-CD, que l'on retrouve dans la circulation sanguine pour devenir des CD classiques (cCD) dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes (Gil-Pulido et Zerneck, 2017).

Dans l'athérosclérose, tout comme les macrophages, les CDs résidant dans l'espace sous-endothélial internalisent les LDLox et se transforment en cellules spumeuses, contribuant à la progression de la pathologie (Paulson et al., 2010) (Figure 27). Par leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes, de nombreuses études ont montré que leur interaction avec les LT favoriserait l'athérogenèse (Sun et al., 2010). Cet effet pro-athérogène serait induit par différents mécanismes tels que la production par les CDs de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IFN γ) activatrices des LT (Koltsova et al., 2012), ou la modulation par les CDs de l'activité des lymphocytes T régulateurs (LTreg), notamment médiée par l'expression de la chimiokine CCL17 qui induirait localement une réduction du nombre de Treg et une augmentation des LT au sein des lésions athéromateuses (Weber et al., 2011).

Les mécanismes par lesquels les CD_s contribueraient à la progression de l'athérosclérose restent à clarifier, mais il semblerait que ces cellules jouent un rôle important dans la captation des lipides et la modulation de la réponse immunitaire adaptative (Zernecke, 2015).

II.C.3.3 Réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative est plus tardive mais présente une spécificité de réponse bien plus importante que la réponse immunitaire innée. Deux types de récepteurs structurellement et fonctionnellement liés permettent la reconnaissance de millions de structures différentes par les LB et les LT. Ce sont les "B-cell receptors" (BCR) et les "T-cell-receptors" (TCR). Tout comme pour les macrophages dans l'immunité innée (M1/M2), les lymphocytes présentent une forte hétérogénéité, avec de nombreux sous-types.

II.C.3.3.1 *Les lymphocytes T*

Les LT peuvent être subdivisés en 2 catégories, les LT CD4⁺ et CD8⁺. L'activation de ces sous-types est effectuée par la reconnaissance des antigènes associés au CMH I ou II, induisant leur prolifération, la sécrétion de cytokines et autres médiateurs solubles. Les LT représentent environ 10% des cellules présentes au sein d'une plaque athéromateuse chez l'homme, dont 70% d'entre eux sont des CD4⁺ (Jonasson et al., 1986). La majorité des LT CD4⁺ au sein de la paroi artérielle sont des "T helper 1" (Th1), reconnus comme étant les contributeurs majeurs de l'expression de cytokines pro-athérogènes (IFN γ , TNF α et IL-1) (Zhou, 2005). D'autres sous-types sont également présents au sein des plaques, comme les Th2, les "regulatory T cells" (Treg), les Th17, les TCR $\gamma\delta^+$ et les "natural killers T" (NKT) (Hansson, Holm, et Jonasson, 2011).

II.C.3.3.1.1 *Les Th2*

Les Th2, initialement découverts il y a une dizaine d'années pour leurs propriétés anti-athérogènes (Binder et al., 2004), auraient des effets plus nuancés sur le développement de l'athérosclérose (Ketelhuth et Hansson, 2011).

II.C.3.3.1.2 *Les Th17*

Les Th17, dont l'une des principales signatures est la sécrétion d'IL-17, font partie des sous-types de LT dont le rôle dans l'athérosclérose est encore mal défini. Certaines études ont montré des propriétés athéroprotectrices, en stabilisant les plaques par la sécrétion de TGF- β (Gisterå et al., 2013), tandis que d'autres ont montré un effet pro-athérogène (Butcher et al., 2012).

II.C.3.3.1.3 *Les NKT*

Les "natural killers T" (NKT) ont été découverts pour la première fois en 1994 par Bendelac et al. (Bendelac et al., 1994). Ces cellules font partie de l'un des sous-types de LT CD4⁺ dont la forme la plus commune est l'"invariant NKT" (iNKT) qui exprime à sa surface des TCRs composés d'une chaîne α invariante. L'activation antigénique des NKT implique l'interaction entre un antigène lipidique présenté par les CPAs, possédant à leur surface des molécules appartenant à la famille des CD1 qui composent le complexe du CMHI, et des TCR spécifiques de ces sous-types de LT. Les NKT agissent aux différents stades du développement de l'athérosclérose et ont été décrits pour leurs effets pro-athérogènes (Getz et Reardon, 2017).

II.C.3.3.1.4 *Les LTreg*

Les LTreg sont identifiés par la présence à leur surface membranaire de marqueurs moléculaires qui sont CD4⁺, CD25⁺ et FOXP3⁺. Ces cellules jouent un rôle important dans le maintien de la tolérance au soi. Le TGF- β et l'IL-10 sécrétés par les LTreg sont les principales cytokines participant aux mécanismes indirects (par leur action sur les CPAs) de régulation de la prolifération des LT et de leur activation (Figure 28). Elles sont également impliquées dans la régulation de la réponse inflammatoire des LB (Meng et al., 2016). Dans l'athérosclérose, des études ont montré leur propriétés athéroprotectrices, médiées par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-35 et TGF- β), entraînant une amélioration de la fonction endothéliale, augmentant le nombre de CMLs, la quantité de collagène, et diminuant l'accumulation de macrophages et de LT CD4⁺ au sein des lésions (Mor et al., 2007) (Figure 28). Chez l'homme, la

diminution des Treg a été associée à la présence de plaques d'athérome vulnérables (Dietel et al., 2013).

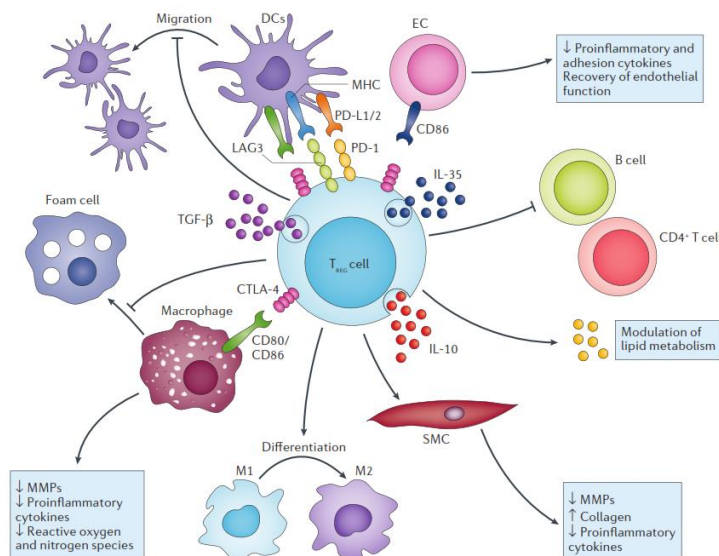


Figure 28 : Rôles des LTreg dans l'athérosclérose. Les LTreg améliorent la fonction endothéliale, inhibent les LB, inhibent l'activation et la migration des DCs, augmentent le contenu en CMLs et en collagène, modulent le métabolisme lipidique et suppriment l'accumulation de macrophages, de LT CD4+, la formation de cellules spumeuses, et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de MMPs (Meng et al., 2016).

II.C.3.3.2 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B se développent à partir de cellules souches hématopoïétiques que l'on retrouve dans la moelle osseuse. L'activation des LB entraîne leur différenciation en cellules B mémoires et plasmocytes sécréteurs d'IgG. Différents sous-types de LB existent (B1, B2).

Le rôle athéroprotecteur de la réponse immunitaire humorale a été mis en évidence pour la première fois par Caligiuri et al. en 2002 (Caligiuri et al., 2002). Les auteurs de cette étude ont observé une augmentation de la formation des lésions athéromateuses chez des souris ApoE^{-/-} présentant une diminution importante de LB par splénectomie, et inversement après transfert de LB spléniques. Cet effet serait attribuable en partie à la production par les LB d'anticorps IgM dirigés contre les LDLox, favorisant leur élimination. D'autres études suggèrent que le mécanisme anti-athérogène médié par les LB serait imputable à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF-β), induisant l'activation des Treg (Strom et al., 2015). Néanmoins, cet effet athéroprotecteur a été remis en question dans de récentes études, dans lesquelles un sous-type de LB, les LB2, ont été inhibés par l'utilisation d'anticorps

dirigés contre CD20, induisant une diminution de la formation des lésions athéromateuses (Ait-Oufella et al., 2010 ; Kyaw et al., 2010).

II.C.3.4 Les micro-ARN (miARN)

Bien que ce ne soit pas leur unique fonction, les micro-ARN peuvent moduler la réponse inflammatoire. Ils ont été découverts en 1993 par Lee et al., chez le nématode *C elegans* (Lee, Feinbaum, et Ambros, 1993). Ce sont des petits fragments d'ARN (18-24 nucléotides) non codants qui régulent au niveau post-transcriptionnel l'expression des gènes, par liaison sur des régions non traduites en 3' (3' UTR) spécifiques de séquences d'ARNm, entraînant une diminution de l'expression du gène par blocage de sa traduction ou en favorisant sa dégradation. Après traduction et maturation des miARN, ceux-ci peuvent être libérés de la cellule au sein de microvésicules (exosomes, microparticules) que l'on peut retrouver dans la circulation sanguine et qui pourront être captées par d'autres tissus via des communications cellule/cellule.

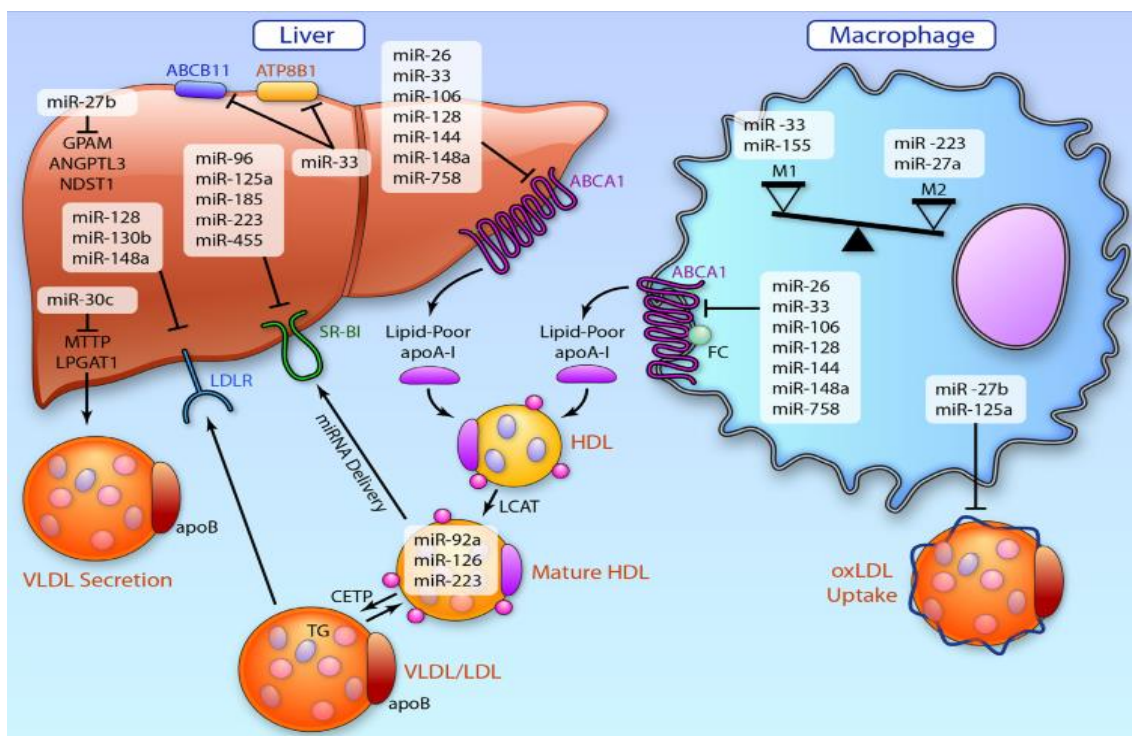


Figure 29 : Rôle des miARN dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et l'activation des macrophages dans l'athérosclérose. Les miARN hépatiques vont réprimer l'expression de gènes impliqués dans la génération des lipoprotéines (miR-30c et miR-27b), la captation (miARN ciblant les LDLR et SRB1) et l'efflux de cholestérol (miARN ciblant ABCA1). Les miARN vont également réguler la polarisation des macrophages en phénotype anti-(miR-223 ou miR-27a) ou pro-inflammatoire (miR-33 ou miR-155), et modulent également la captation de lipoprotéines et la formation de cellules spumeuses (Feinberg et Moore, 2016).

Dans des contextes pathologiques, ce mécanisme de régulation des gènes est perturbé, avec une dérégulation de l'expression de ces miARN. Certains modulent le métabolisme des lipides. Par exemple, dans le foie, l'augmentation d'expression de certains miARN va réprimer l'expression de protéines impliquées dans l'efflux du cholestérol (ABCA1), la captation (cible : le LDLR et SRB1), la formation et la sécrétion de lipoprotéines (miR-30c et miR-27b) (Figure 29). Certains vont réguler l'expression de gènes impliqués dans l'athérosclérose via l'activation de mécanorécepteurs au sein des CEs, comme par exemple miR-92, dont l'expression est activée lorsque les contraintes de cisaillement sont constantes (Feinberg et Moore, 2016), inhibant les facteurs de transcription "Krüppel-like factor" 2 et 4 (KLF2/4). Certains ont des propriétés anti-inflammatoires, comme miR-146a, qui est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes pro-inflammatoires, et dont l'effet principal est de réduire la réponse des CEs à des stimuli pro-inflammatoires (cytokines). D'autres vont voir leur niveau d'expression réprimé durant l'athérosclérose, comme par exemple le couple de miR 143/145 au sein des CMLs. Dans des conditions physiologiques, ces miR régulent les facteurs de transcription KLF4/5, la myocardine et l'ELK-1, dont les rôles dans les modulations phénotypiques des CMLs sont bien connus, passant d'une cellule contractile, mature, différenciée, à un phénotype dédifférencié et prolifératif (Cordes et al., 2009).

L'initiation de la formation des plaques d'athérome est caractérisée par une dysfonction endothéliale induisant une augmentation de la perméabilité de l'intima à des sites spécifiques de l'arbre artériel, favorisant l'infiltration des LDL-C. L'oxydation des LDL-C dans l'espace sous-endothélial, ainsi que l'activation de gènes pro-inflammatoires par les modifications des contraintes mécaniques de la paroi artérielle, vont être à l'origine de la réponse inflammatoire caractérisée par l'activation des cellules endothéliales, induisant le recrutement de monocytes/macrophages et autres cellules de l'immunité dans l'intima.

II.D Progression de l'athérosclérose

Ce stade est caractérisé par une accumulation de lipides extracellulaires formant un cœur lipidique, et par l'induction d'une réponse fibro-proliférative (remodelage vasculaire) entraînant la formation d'une chape fibreuse. La dégradation par les métalloprotéases de la matrice extracellulaire et de la limitante élastique interne permet aux cellules musculaires lisses de migrer vers l'intima, et de proliférer, entraînant des modulations phénotypiques de celles-ci. Leur devenir au sein de l'espace intimal est primordial dans la progression des lésions athéromateuses, notamment dans leur caractère vulnérable.

II.D.1 *Rôle des cellules musculaires lisses (CMLs)*

La phase de migration et de prolifération des CMLs représente l'un des marqueurs de la progression de l'athérosclérose. Ce mécanisme a lieu en réponse à un processus inflammatoire. Le rôle des CMLs au sein des lésions athéromateuses est complexe de par leur plasticité et leur origine embryonnaire.

II.D.1.1 Origine embryonnaire des CMLs

Des travaux suggèrent que l'origine embryonnaire des CMLs influencerait le développement de l'athérosclérose. En effet, en fonction de la région vasculaire, les CMLs n'ont pas la même origine développementale. Par exemple, les CMLs des artères coronaires proviennent de l'épicardium, alors que les CMLs de l'aorte ascendante et de la crosse aortique sont dérivées de la crête neurale. DeBakey et Glaeser ont suggéré dans une étude publiée en 2000 que la réponse des CMLs à l'exposition de facteurs de risque systémiques (diabète, hypertension et cholestérol) était différente en fonction de la localisation des cellules (crosse aortique, artères coronaires, aorte abdominale) et donc de leur origine embryonnaire (DeBakey et Glaeser, 2000). Ces travaux ont été corroborés dans la même année par McGill et al. (McGill et al., 2000). A ce jour, aucun mécanisme transcriptionnel et/ou épigénétique n'a été identifié permettant d'expliquer ces observations.

II.D.1.2 Modifications phénotypiques des CMLs

Au sein de la média, les cellules musculaires lisses, au phénotype contractile, expriment différents marqueurs protéiques tels que la chaîne lourde de la myosine (MYH11), l'actine α 2 (ACTA2), la smoothéline. Durant l'athérosclérose, elles vont entrer dans un processus de dédifférenciation (Owens, Kumar, et Wamhoff, 2004). La MEC jouerait un rôle essentiel dans ce mécanisme (Bennett, Sinha, et Owens 2016). En effet, des études ont suggéré que l'absence de protéines constitutives de la MEC, médiée par la sécrétion de MMPs par les macrophages et les CMLs, entrainerait une dédifférenciation de celles-ci, facilitant leur migration et leur prolifération (Koyama et al., 1996). La myocardine, un coactivateur du SRF (Serum Response Factor), est l'une des protéines clés de cette régulation phénotypique. Ackers-Johnson et al. ont montré chez un modèle de souris ApoE^{-/-} que l'absence partielle du gène codant pour la myocardine (+/-) entraînait une diminution du développement de l'athérosclérose (Ackers-Johnson et al., 2015). Le facteur de transcription "Krupple-like factor" 4 (KLF4), impliqué dans l'induction des cellules souches pluripotentes (iPSCs), a également été identifié comme un facteur important de

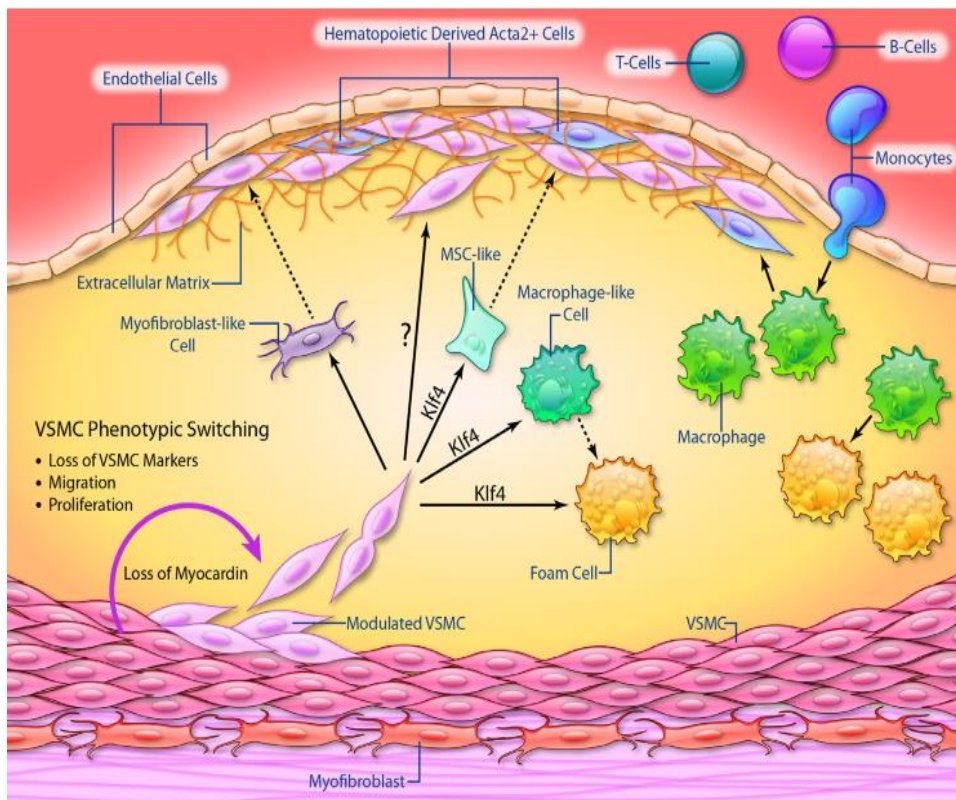


Figure 30 : Synthèse des dernières connaissances sur l'identité et l'origine des CMLs, des macrophages et des dérivés de ces cellules impliqués dans l'athérosclérose (Bennett, Sinha, et Owens, 2016).

différenciation de ces cellules (Yoshida, Kaestner, et Owens, 2008) (Figure 30). Récemment, des études rigoureuses ont permis de mettre en lumière ces modifications phénotypiques (Feil et al., 2014 ; Shankman et al., 2015). Il a été observé dans ces études qu'environ 40% des cellules au sein des lésions avancées présentaient conjointement le marqueur des macrophages (CD68) et le marqueur des CMLs (ACTA2). Ces travaux remettent partiellement en cause la notion selon laquelle la présence des CMLs au sein de l'intima serait athéroprotectrice. Cette fonction stabilisatrice des plaques a été observée et étudiée par de nombreux groupes de recherche (Schwartz, Virmani, et Rosenfeld, 2000). En effet, les ruptures de plaque sont plus fréquentes au sein de lésions présentant une chape fibreuse amincie par la mort cellulaire des CMLs et la dégradation de la MEC. De plus, des études ont montré que le mécanisme de cicatrisation de ces plaques était médié en grande partie par les CMLs et leur fonction de synthèse de protéines de la MEC (MacLeod et al., 1994).

Aux vues des dernières découvertes, ce rôle athéroprotecteur imputé aux CMLs au sein des lésions athéromateuses serait à nuancer et dépendrait essentiellement de leur transition phénotypique. Par exemple, le passage de CMLs en macrophages aurait des effets pro-athérogènes médiés par leur capacité limitée à éliminer les lipides, les débris cellulaires et par leur action pro-inflammatoire, tandis que le maintien de leur capacité de synthèse de molécules de la MEC favoriserait la stabilisation des plaques (Bennett, Sinha, et Owens, 2016).

II.D.1.3 La sénescence des CMLs

La sénescence est définie par la perte des capacités prolifératives d'une cellule. Le raccourcissement des télomères est l'une des caractéristiques de ce processus. Il a été observé au sein des lésions athéromateuses un raccourcissement des télomères des CMLs, mais également des CEs et des leucocytes (Ogami et al., 2004 ; Panayiotou et al., 2010).

La régulation de la balance entre les phénomènes de prolifération/synthèse des CMLs et de mort cellulaire/sénescence est un processus crucial pour le devenir des lésions athéromateuses, leur conférant un caractère stable ou vulnérable.

II.D.2 *Rôle de l'apoptose*

Les cellules apoptotiques sont retrouvées en faible quantité au stade initial, et leur nombre augmente au fur et à mesure que la pathologie progresse. Au sein des lésions, les cellules en apoptose sont majoritairement des macrophages et des CMLs (Bennett, Evan, et Schwartz, 1995 ; Moore et Tabas, 2011). Chez l'homme, un lien étroit a été observé entre l'apoptose des CMLs et la rupture de plaque vulnérable (Bauriedel, 1999). L'apoptose des macrophages et des CMLs a lieu tout au long du développement des lésions athéromateuses et peut influencer la formation précoce des plaques, leur progression et leur stabilité (Moore et Tabas, 2011). De nombreux mécanismes sont responsables de la mort cellulaire au sein des lésions. L'apoptose est activée par la stimulation de caspases (3 et 9). Deux types de voies de signalisation induiraient son activation. La voie intrinsèque, activée par des signaux intracellulaires tels que le stress du réticulum endoplasmique (RE), le stress oxydatif ou des altérations de l'ADN, et la voie extrinsèque qui dépend essentiellement de signaux tels que les DAMPs et certaines cytokines. La voie intrinsèque met en jeu la réponse UPR (unfolded protein response), médiée par l'augmentation de la protéine CHOP (CCAAT/enhancer binding-protein-homologous protein), qui entraîne la libération de calcium du RE et l'activation de la voie de signalisation de la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline dépendantes II (CAMKII) (Moore et Tabas, 2011). La voie extrinsèque quant à elle active des récepteurs de mort cellulaire (FAS, TNF-R1), entraînant l'activation de la caspase 3.

Les cellules apoptotiques vont libérer des molécules attractantes (phosphatidylsérines) des cellules phagocytaires permettant l'élimination de leurs débris, phénomène appelé efférocytose. Au sein des lésions athéromateuses, les macrophages et les CD4 sont les principales cellules impliquées dans ce phénomène. L'efférocytose est un processus athéroprotecteur dans les phases précoces (Gautier et al., 2009). Le défaut d'efférocytose conduit à la nécrose des macrophages impliqués dans ce processus, à l'origine de la formation du cœur lipidique et de la déstabilisation des plaques (Schrijvers et al., 2007). A ce jour, les mécanismes impliqués dans la dérégulation de l'efférocytose dans l'athérosclérose sont partiellement identifiés.

II.D.3 *Le remodelage des lésions*

II.D.3.1 Le remodelage positif

Le remodelage positif décrit par Glagov et al. correspond à l'élargissement de la limitante élastique externe au cours du développement de l'athérosclérose (Glagov et al., 1987). Ce phénomène permet de préserver la lumière des artères malgré la croissance d'une plaque d'athérome. Des études anatomopathologiques ont montré que le rétrécissement de la lumière avait lieu lorsque le volume de la plaque représentait 45% du volume total de l'artère.

Ce mécanisme implique des modifications de la MEC induites par la synthèse via les CMLs, ou la dégradation par les métalloprotéases des constituants de la matrice.

II.D.3.2 Les métalloprotéases (MMP)

La production des MMPs par les macrophages contribue à la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques. A ce jour, 23 MMPs ont été identifiées. Leur activité est régulée par l'expression de "tissue inhibitor metalloproteinase" (TIMP) (Nagase, Visse, et Murphy, 2006). Au sein des lésions athéromateuses, ces MMPs sont exprimées par les CEs, les CMLs et les macrophages. Elles favorisent le remodelage de la plaque d'athérome, la migration des CMLs et la dégradation de la capsule fibreuse. Chez l'homme, leurs effets sur la déstabilisation des plaques ont également été observés et ont été associés à des plaques vulnérables (Galis et al., 1994).

II.D.3.3 La néoangiogenèse

La formation de néovaisseaux est l'une des caractéristiques des plaques avancées. Le principal stimulus est induit par la sécrétion de facteurs hypoxiques ("Hypoxia inducible factor-1" ou HIF-1) libérés par les macrophages présents au sein du cœur nécrotique des lésions athéromateuses (Moreno et al., 2006). L'activation de facteurs pro-angiogéniques tels que le "Vascular endothelial growth factor" (VEGF) et la "nitric oxide synthase" (NOS) en sont les principaux facteurs d'initiation. La formation de ces microvaisseaux perméables est à l'origine des plaques hémorragiques, responsables de l'expansion rapide du cœur

nécrotique, en partie liée à l'accumulation de cholestérol libre provenant des érythrocytes et à l'infiltration de cellules de l'immunité (Kolodgie et al., 2003).

II.D.3.4 Calcification

La présence de calcifications au sein des lésions athéromateuses est associée à toutes les étapes du développement de l'athérosclérose. Ce processus, décrit auparavant comme passif, est devenu au fil des années un mécanisme régulé, complexe, associé aux processus inflammatoires. Le rôle exact des calcifications dans l'athérosclérose reste, de nos jours, mal défini. Certaines études suggèrent que ce phénomène se produirait en réponse à un mécanisme de cicatrisation induit par l'inflammation et la nécrose, médié en partie par la libération de vésicules extracellulaires via les CMLs et les macrophages (Kapustin et al., 2011, New et al., 2013). Ces vésicules sont composées de calcium et de phosphate, formant des cristaux d'hydroxyapatite (Demer et Tintut, 2008). L'oxydation des LDL-C serait en partie responsable de la formation de ces cristaux, entraînant une différenciation des CMLs en phénotype calcique (Goettsch et al., 2011). La présence de micro-calcifications (<30 µm) au sein de la chape fibreuse induirait un stress mécanique local résultant en la rupture de celle-ci (Kelly-Arnold et al., 2013), contrairement à la formation de macro-calcifications (>30 µm) qui serait associée plutôt à un mécanisme de réparation, stabilisateur (Hutcheson et al., 2016).

II.D.4 *Résolution de l'inflammation*

Dans des conditions physiologiques normales, la réponse inflammatoire est associée à une phase résolutive, dont le principal objectif est la réparation des dommages collatéraux et la restauration de l'homéostasie des tissus environnants. Cette phase est induite par des lipides endogènes appelés "specialized pro-resolving mediators" (SPMs), et des cytokines comme l'IL-10, le TGF-β et l'annexine A1 (Buckley, Gilroy, et Serhan, 2014). L'activation de récepteurs spécifiques à la surface membranaire de cellules effectrices va promouvoir l'élimination des débris cellulaires, d'agents pathogènes et de cellules apoptotiques (Serhan et al., 2010). Les maladies chroniques inflammatoires présentent un défaut dans ce mécanisme de résolution de l'inflammation, induit par une dérégulation des médiateurs impliqués dans l'arrêt du processus

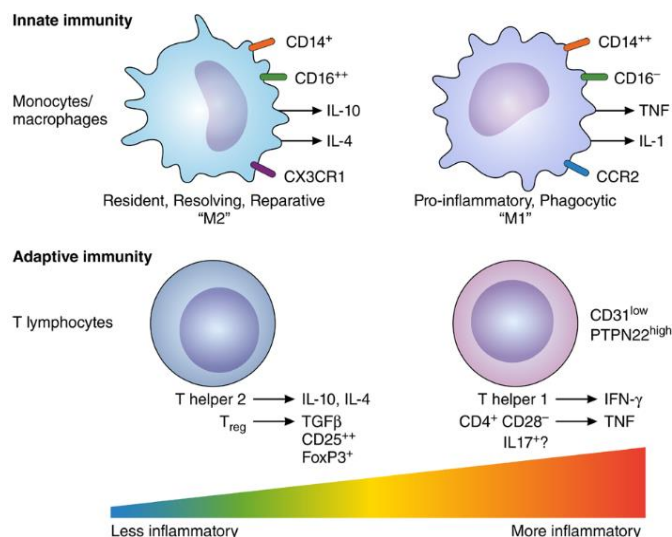


Figure 31 : La dérégulation de l'immunité innée et/ou adaptative module l'activité de la plaque d'athérome. Des sous-types de LT, participant majoritairement à l'immunité adaptative, peuvent promouvoir une inflammation locale au sein des lésions (LT effecteurs) ou réprimer celles-ci par l'intermédiaire des LTreg. Les LT effecteurs sont caractérisés par des marqueurs de surface tels que CD31 et une forte activité de la protéine tyrosine phosphatase (N22). Les LTreg sont identifiables par des hauts niveaux d'activation de CREB (cAMP-responsive element binding protein) (Crea et Libby, 2017).

étroitement liées, le défaut de résolution de l'inflammation par les macrophages au sein des lésions athéromateuses provoque également une dérégulation de la réponse médiée par les LT effecteurs (Figure 31). En temps normal, celle-ci est contrôlée par les LTreg qui vont sécréter leurs cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF-β) et diminuer le nombre de Teff. Chez l'homme, les patients présentant un SCA ont une réduction du nombre de Treg, en comparaison à des coronariens stables (Crea et Liuzzo, 2013). Le risque de SCA dépend essentiellement de cette balance entre la promotion de l'inflammation et ses mécanismes de résolution au travers des différents processus physiologiques précédemment cités (Fredman et al., 2016).

inflammatoire. La persistance de l'inflammation médiée par les DAMPs ou des lésions tissulaires joue un rôle central dans le développement des plaques, notamment dans leur caractère instable (Crea et Libby, 2017). Les plaques vulnérables humaines possèdent généralement un défaut d'efférocytose associé à une nécrose et une inflammation importante (Geng et Libby, 1995). L'immunité innée et adaptative étant

La progression de l'athérosclérose est caractérisée par la migration des CMLs de la media vers l'intima. Elle est également marquée par la formation d'un cœur lipidique et nécrotique résultant de l'apoptose des cellules spumeuses (riches en cholestérol), ainsi que par l'induction d'une réponse fibro-proliférative par les CMLs, aboutissant à la formation d'une capsule fibreuse et d'un remodelage vasculaire (excentrique).

Le défaut d'efférocytose et donc la "non résolution du processus inflammatoire" confère à ces lésions un caractère vulnérable qui peut être responsable de la formation d'un thrombus à l'origine des syndromes coronariens.

II.E Les plaques vulnérables

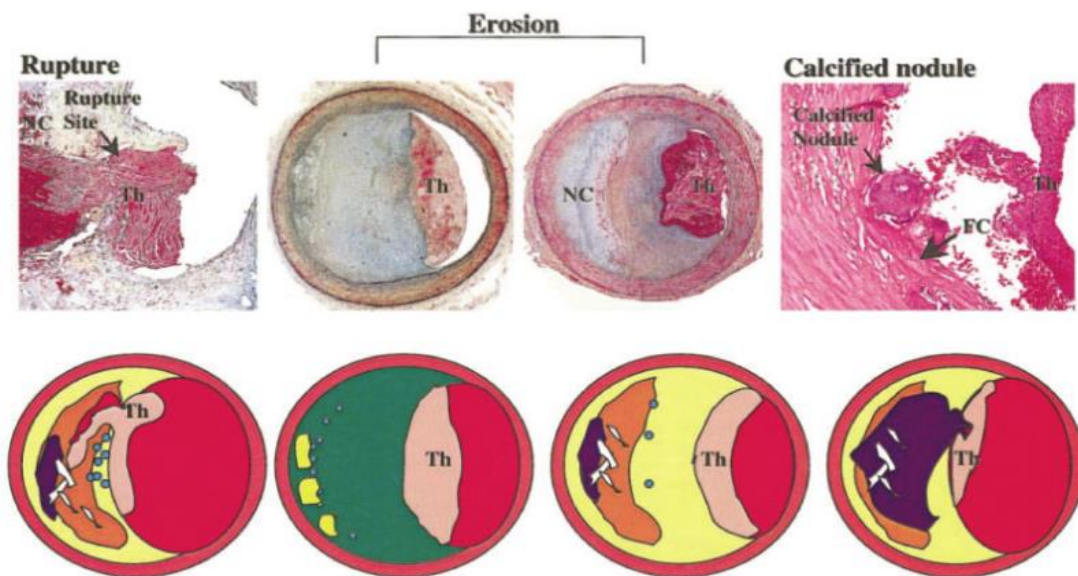


Figure 32 : Lésions athéromateuses responsables de la formation d'un thrombus luminal (Virmani et al., 2000).

Les plaques athéromateuses sont multiples au sein d'un individu, mais seules quelques-unes deviennent symptomatiques. La majorité des événements athérothrombotiques responsables du SCA sont induits par la rupture/fissure et ou l'érosion de la plaque d'athérome vulnérable entraînant une occlusion partielle ou complète de l'artère coronaire (Figure 32).

II.E.1 Notion de vulnérabilité



Figure 33 : Le patient vulnérable dépend de la vulnérabilité de la plaque et/ou du sang et/ou du myocarde (Naghavi et al., 2003)

Le concept de plaque vulnérable a été décrit pour la première fois par Muller et al., à la fin des années 80 (Muller, 1989). Ces lésions étaient définies comme des plaques hémodynamiquement peu significatives mais susceptibles de se rompre. Virmani et al. ont identifié différents mécanismes responsables de la formation de ces thromboses coronaires que sont les ruptures de plaques, l'érosion de plaques, les plaques hémorragiques et les nodules calciques (Virmani et al., 2000). En 2003, un document consensus a été publié dans le but de clarifier le terme de "plaque vulnérable", et comprend toutes les plaques responsables d'un évènement athérotrombotique. La plaque vulnérable n'est pas à elle seule responsable du SCA. Un "sang vulnérable" (propriétés thrombogéniques élevées) et un "cœur vulnérable" (susceptible aux arythmies) jouent un rôle important dans l'apparition des symptômes (Figure 33). C'est selon cette logique que le concept de "patient vulnérable" a été décrit (Naghavi et al., 2003). Dans le but d'identifier les patients à risque, c'est à dire les patients vulnérables, les auteurs ont suggéré la mise au point d'une méthode cumulative d'évaluation du risque basée sur la mesure de ces différents paramètres (la plaque, le sang et le cœur) à l'aide de techniques émergentes telles que l'imagerie invasive ou non invasive et les dosages sériques de biomarqueurs.

Ces dernières années ont été très riches en enseignement concernant les différents mécanismes responsables d'athérotrombose des plaques vulnérables, que sont les ruptures de plaque, l'érosion de plaque et les nodules calciques.

II.E.2 Les plaques vulnérables

II.E.2.1 La rupture de plaque de type TCFA

La plaque sujette à rupture est la forme la plus commune de plaque vulnérable. Elle est responsable des 2/3 des IM et des morts subites (Richardson,

Davies, et Born, 1989 ; Davies et al., 1993). Elle est caractérisée par la rupture/fissure de la chape fibreuse menant à la formation d'un thrombus (thrombus rouge) (Falk, Shah, et Fuster, 1995). Des études anatomopathologiques ont montré une relation inverse entre l'épaisseur de la chape fibreuse et le risque de rupture de plaque, avec plus de 95% de survenue de rupture pour des lésions ayant une épaisseur de chape fibreuse <65 μm (Burke et al., 1997). Ces ruptures ont généralement lieu au niveau de zones de faiblesse de la capsule fibreuse, plus fréquemment situées au niveau des régions d'épaulement (Figure 34). Néanmoins, ce constat n'a pas été observé durant l'effort où les ruptures sont aussi courantes dans les régions médianes de la chape fibreuse que dans les zones d'épaulement (Burke et al., 1999). En plus de ces contraintes mécaniques, il semblerait que la présence de micro-calcifications au sein de la capsule fibreuse soit également l'un des mécanismes responsables de la rupture de plaque (Vengrenyuk et al., 2006).

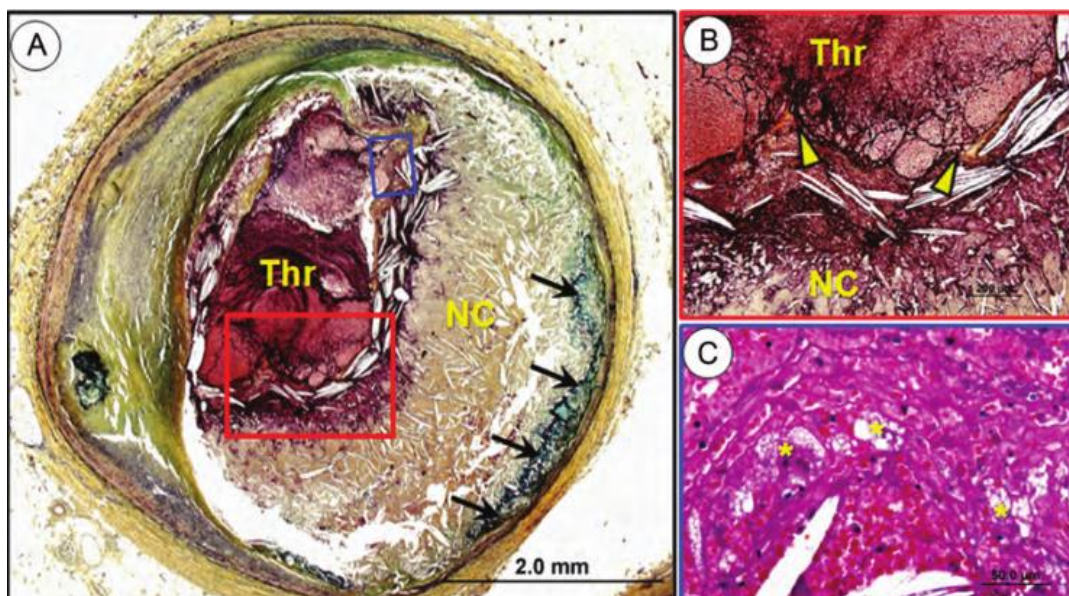


Figure 34 : Rupture de plaque. Coupe transversale d'une artère coronaire présentant une rupture de plaque. (A) Présence d'un thrombus occlusif avec un large cœur nécrotique sous-jacent et une quasi absence de chape fibreuse. On peut également observer la présence de calcifications (flèches noires). (B) Grossissement au niveau du site de rupture (carré rouge A) avec déchirure de la chape fibreuse (flèche jaune). (C) Grossissement du thrombus (carré bleu A) avec inclusion de macrophages et globules rouges (*), en présence de cristaux de cholestérols (Falk et al., 2013). Thr= Thrombus, NC= Cœur nécrotique

La rupture survient sur des plaques de type "Thin cap fibrous atheroma" (TCFA). Celles-ci sont généralement plus fréquentes chez des patients avec un taux de cholestérol élevé, fumeurs, chez les femmes de plus de 50 ans, et chez les patients avec des taux élevés de hsCRP (Virmani et al., 2006). Elles présentent une accumulation importante de macrophages, de LT activés, de CD₄, et de

mastocytes, associée à un amincissement de la chape fibreuse, et d'une augmentation de la néovascularisation aux sites de rupture (Shah et al., 1995). Les MMPs et les protéases sont également localisées au sein de ces lésions, induisant une diminution des fibres de collagène, et provoquant l'amincissement de la chape fibreuse (Galis et al., 1994). L'un des paramètres morphologiques permettant de différencier les TCFA des ruptures est l'épaisseur de la capsule fibreuse, qui est comprise entre 55-84 μm pour les TCFA et $<55 \mu\text{m}$ pour les ruptures (Narula et al., 2013). Ces plaques sont définies comme des lésions instables à haut risque de rupture.

II.E.2.2 L'érosion de plaque

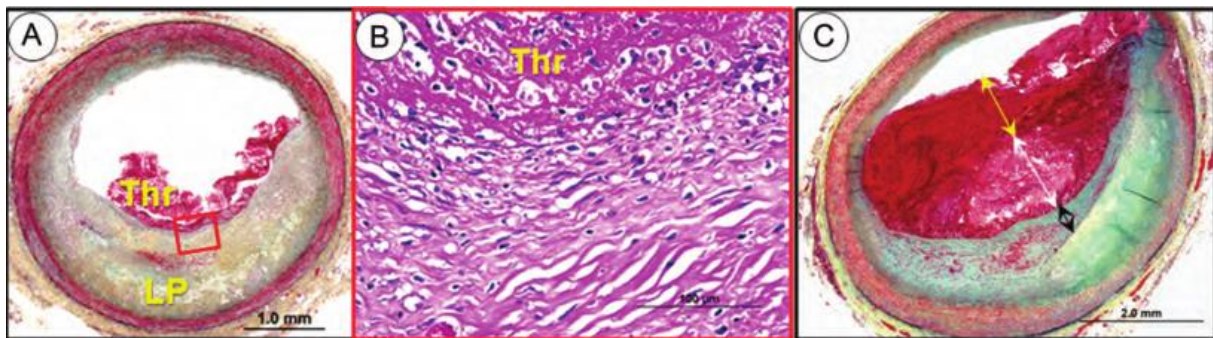


Figure 35 : Erosion de plaque : Coupe transversale d'une artère coronaire présentant une érosion de plaque. (A) Thrombus non occlusif sur la surface de la lésion qui correspond à un épaississement de l'intima associé à un rétrécissement de la lumière. (B) Grossissement de la région (carré rouge A) correspond à la formation du thrombus et de la plaque sous-jacente composée de CMLs au sein d'une MEC riche en protéoglycanes/collagène et en l'absence d'inflammation. (C) Deuxième cas d'érosion de plaque composée d'un thrombus organisé (double flèche noire) et de CMLs et d'un second thrombus aigu dans la lumière du vaisseau (double flèche jaune et blanche) (Falk et al., 2013).

Tout comme les TCFA, ces plaques se développent préférentiellement dans des régions présentant de faibles contraintes de cisaillement. En revanche, elles sont caractérisées par un cœur lipidique de faible volume, de nombreux protéoglycanes et glycosaminoglycanes, peu de cellules de l'inflammation, une apoptose des cellules endothéliales, et de nombreux triglycérides (Figure 35) (Libby et Pasterkamp, 2015). De plus, des études ont également montré une fréquence plus importante de complications liées à la fragmentation du thrombus, et la génération d'un embolie en aval de la lésion pour les érosions de plaque en comparaison des ruptures de plaque avec 71% vs 42% respectivement (Schwartz et al., 2009). Contrairement aux ruptures de plaque, celles-ci présentent généralement un remodelage négatif (Burke et al., 2002).

Les mécanismes impliqués dans la desquamation des CEs par apoptose restent encore mal identifiés. Des études récentes suggèrent que le TLR2 jouerait un rôle

important dans ce processus. En effet, ce récepteur est surexprimé au sein des lésions humaines (Edfeldt et al., 2002), tout comme son ligand et activateur, l'acide hyaluronique, un glycosaminoglycane présent également en quantité élevée. De plus, l'expression du TLR2 est corrélée à la quantité de cellules endothéliales en apoptose et à la présence de NETs dans les plaques humaines, caractéristiques des érosions de plaque.

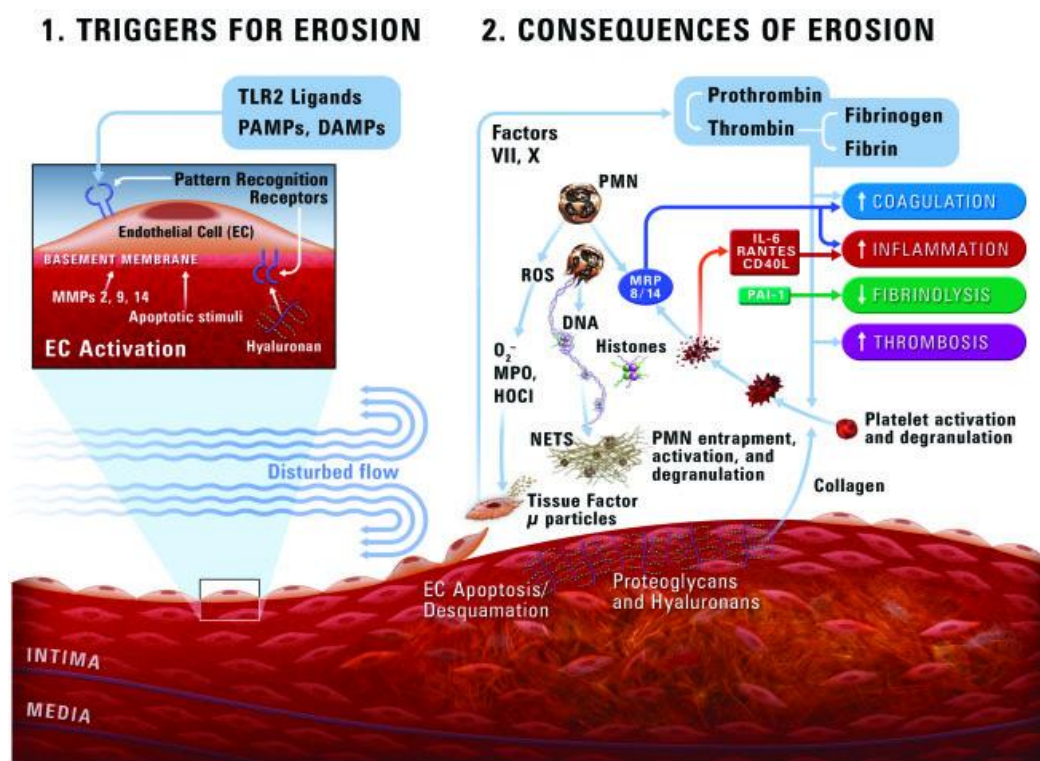


Figure 36 : Schéma présentant les différents mécanismes physiopathologiques de la formation des érosions de plaque conduisant à la génération d'un thrombus (Quillard et al., 2015).

Les mécanismes impliqués dans la formation du thrombus, associé aux érosions de plaque, ont été décrits dans l'"European Heart Journal" (Quillard et al., 2015) (Figure 36). Brièvement, les inducteurs de l'apoptose des CE sont nombreux et comprennent les DAMPs, les PAMPs, et d'autres ligands au récepteur de l'immunité innée (TLR2). Il existe également d'autres stimuli apoptotiques au sein de ces lésions comme les LDLox qui peuvent favoriser l'apoptose des CE. Les métalloprotéases vont dégrader les protéines de la MEC, entraînant un détachement des CE de la membrane basale de l'intima. Après desquamation de ces cellules, les CE en apoptose vont libérer des microvésicules contenant du facteur tissulaire (FT), accélérant l'activité des facteurs de coagulation VII et X, augmentant la formation de thrombine et entraînant la conversion du fibrinogène en fibrine. L'exposition de la MEC va servir de substrat pour l'adhésion des

granulocytes, leur activation et leur dégranulation. Ces cellules vont libérer des espèces réactives de l'oxygène (HOCL, O₂⁻...). Les neutrophiles apoptotiques vont libérer leur ADN et leurs histones formant les "Neutrophils Extracellular Traps" (NETs). Ces structures servent à la capture des leucocytes circulants, induisant une augmentation de la réponse inflammatoire. L'exposition des macromolécules de la MEC de l'espace sous-endothélial peut activer les plaquettes provoquant leur dégranulation et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (IL-6 et RANTES). Les plaquettes vont également sécréter le "plasminogen activator inhibitor-1" (PAI-1), inhibiteur majeur de la fibrinolyse, stabilisant le caillot.

Généralement, la formation d'un thrombus mural (thrombus blanc, riche en plaquettes) induit par l'érosion de plaque entraîne l'occlusion partielle de l'artère coronaire. Dans une étude anatomopathologique récente, 88% des érosions de plaque présentaient des cicatrises caractérisées par la résorption du thrombus, recouvert par la formation de couches de CMLs, de CEs et de plaquettes/fibrine (Kramer et al., 2010).

II.E.2.3 Les nodules calciques

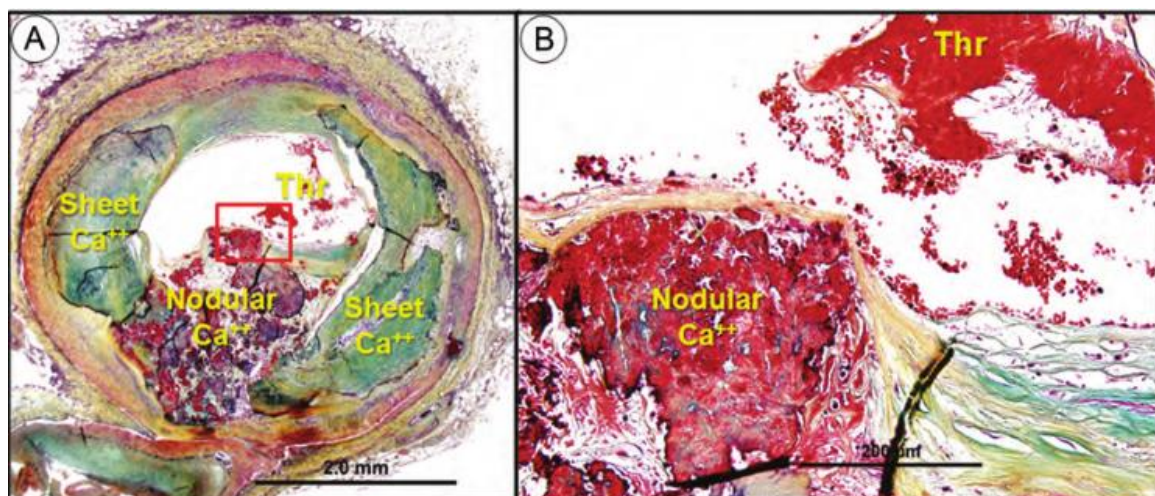


Figure 37 : Nodules calciques. Coupe transversale d'artère coronaire montrant la présence de nodules calciques. Les calcifications nodulaires sont identifiées entre les feuillets de calcium (A). Agrandissement du carré rouge (B). Les nodules calciques sont saillis dans la lumière artérielle associés à un thrombus non occlusif (Falk et al., 2013).

La 3^{ème} étiologie des thromboses coronaires est la formation de nodules calciques au sein des lésions athéromateuses (Figure 37). Ces plaques sont caractérisées par la présence de fractures de plaques calciques, entremêlées de fibrine et d'une chape fibreuse désorganisée avec un thrombus sus-jacent. C'est la cause la moins fréquente de thrombose luminale, avec une incidence comprise entre 4 et 7% (Virmani et al., 2000).

II.E.3 *L'athérombose*

Dans la majorité des cas, la formation d'un thrombus, qu'il soit mural (angor stable) ou oblitérant, a lieu en cas de rupture, de fissure ou d'érosion de l'endothélium vasculaire de la plaque vulnérable et fait suite à la mise en contact des éléments hautement thrombogènes de la plaque (FT, molécules de la MEC, phospholipides) avec ceux du sang (facteurs de coagulation et plaquettes). Le SCA sans sus-décalage est souvent caractérisé par la formation d'un thrombus non oblitérant ou transitoirement occlusif, tandis que le SCA avec décalage du segment ST est généralement spécifique des thrombus oblitérants et stables. L'athérombose est donc la résultante d'une dérégulation de l'hémostase, mécanisme physiologique permettant la cicatrisation d'une lésion vasculaire. Ce processus est médié par 3 étapes présentées comme des événements distincts mais étroitement liés. L'hémostase primaire, dont le principal mécanisme est l'activation et l'agrégation des plaquettes, va permettre la formation d'un agrégat plaquettaire instable. Puis, celui-ci va être consolidé par une cascade d'activations enzymatiques résultant en la transformation du fibrinogène soluble en fibrine (hémostase secondaire). Enfin, après cicatrisation de la lésion, l'étape de fibrinolyse permettra la dissolution du caillot.

II.E.3.1 *L'hémostase*

II.E.3.1.1 *Hémostase primaire*

II.E.3.1.1.1 *Agrégation plaquettaire*

Le rôle primaire des plaquettes est de colmater les lésions vasculaires afin de prévenir toute hémorragie liée à des lésions de l'endothélium vasculaire. Les plaquettes sont des cellules anucléées de 2-3 μm de diamètre, qui ont une durée de vie comprise entre 5 et 9 jours. Elles sont produites à partir des mégacaryocytes (moelle osseuse, poumon) (Lefrançais et al., 2017) et environ 1/3 d'entre elles sont stockées dans la rate. Le principal mécanisme d'action des plaquettes est médié par leur capacité sécrétoire et d'agrégation. Elles contiennent 3 types de granules :

- Alpha : majoritaires au sein des plaquettes, elles sont composées de diverses protéines nécessaires à l'arrêt du saignement telles que des facteurs de coagulation (V, IX, XIII), des protéines d'adhésion (Facteur de

Von Willebrand, fibrinogène), la β -thromboglobine et également la P-sélectine, PECAM-1, et l'intégrine α IIb β 3.

- Delta ou denses : contiennent principalement des amines vaso-actives (sérotonine) et des nucléotides (ADP, ATP).
- Les lysosomes : renferment des collagénases, hydrolases et phosphatases acides.

Trois étapes ont été décrites dans l'hémostase primaire (Figure 41) (Franchi et Angiolillo, 2015) :

II.E.3.1.1.2 *Adhésion des plaquettes*

En fonction des contraintes de cisaillement, l'adhésion plaquettaire fera intervenir des mécanismes différents. Lorsque ces contraintes sont élevées, le facteur de Von Willebrand va se déposer sur le collagène présent à la surface de la zone lésée, se déplier, et libérer ses sites de fixation aux plaquettes (GP1b-VI-IX) (Lenting et Adam, 2012). Cette phase de "roulement" plaquettaire va faire intervenir une seconde molécule, le collagène, afin de stabiliser leur adhésion. Dans ces conditions de faibles contraintes de cisaillement, les plaquettes vont adhérer au collagène via leur récepteur (GP1a/2a) (Varga-Szabo, Pleines, et Nieswandt, 2008).

II.E.3.1.1.3 *Activation et recrutement*

La liaison du collagène à ces récepteurs initie l'activation des plaquettes et déclenche des mécanismes intracellulaires, ayant pour effets notables des modifications phénotypiques (d'une forme discoïde vers une forme sphérique) et physiologiques de celles-ci. Les principaux facteurs d'activation plaquettaire libérés pendant cette phase sont le thromboxane A₂ (TxA₂), l'ADP et la thrombine (Davi et Patrono, 2007).

Le thromboxane A₂ : Il est synthétisé par les plaquettes activées à partir d'acide arachidonique via la voie de signalisation de la cooxigénase (COX), celui-ci va diffuser au travers de la membrane plasmique et activer les plaquettes à proximité. Les récepteurs aux thromboxanes (TP α et TP β) font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, qui une fois stimulés, activent la phospholipase C, libérant les seconds messagers intracellulaires que sont

l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG) (Figure 38). Le DAG va

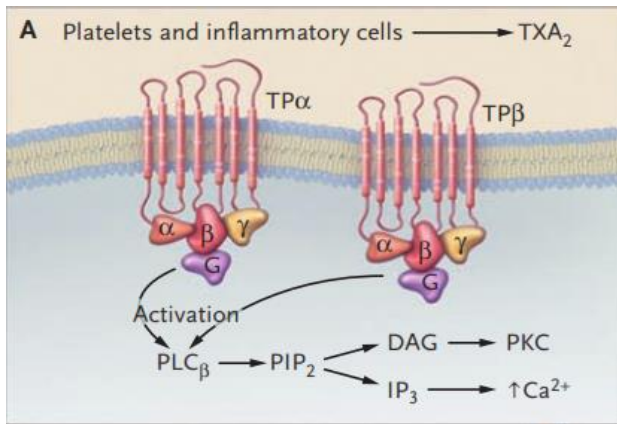


Figure 38 : Activation des plaquettes par le thromboxane A2 par liaison à ses récepteurs, TPα et TPβ. (Davi et Patrono, 2007)

stimuler la protéine kinase C, responsable de l'activation des voies de signalisation des "mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases" (MERK/ERK) et p38 induisant la sécrétion du TxA2, tandis que l'IP3 va augmenter les concentrations cytoplasmiques de Ca^{2+} entraînant le raccourcissement

des filaments d'actine/myosine (changement de forme des plaquettes), la sécrétion des granules, et l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ (Varga-Szabo, Braun, et Nieswandt, 2009).

L'adénosine diphosphate: L'ADP est libéré par les plaquettes et les globules rouges. L'interaction avec son récepteur $P2Y_{12}$ est essentielle dans l'activation et

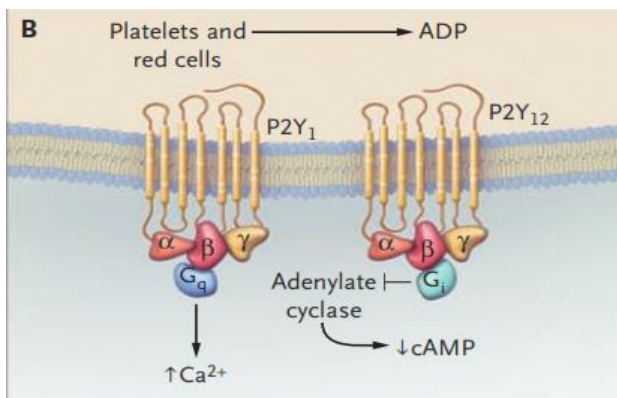


Figure 39 : Activation des plaquettes par la fixation de l'ADP à ses récepteurs plaquettaires que sont $P2Y_1$ et 12 (Davi et Patrono, 2007).

l'agrégation plaquettaire (Figure 39). En effet, l'activation de son récepteur couplé aux protéines G va entraîner une cascade d'évènements de signalisation intracellulaire

(inactivation de l'adénylate cyclase, activation de la PI3K) et induire un changement conformationnel de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ (signalisation "inside-out"). Cet état de forte affinité est à l'origine de la liaison

avec son ligand, le fibrinogène soluble, et de la formation de ponts intra-plaquettaires (agrégation). Les plaquettes activées (soit par l'ADP, soit par d'autres antagonistes) vont elles-mêmes sécréter de l'ADP, potentialisant ce phénomène.

La thrombine : Elle est le produit d'une cascade enzymatique faisant intervenir de nombreux facteurs plasmatiques de la coagulation et du facteur tissulaire. La thrombine protéolyse le fibrinogène en fibrine, stabilisant le caillot. Elle a

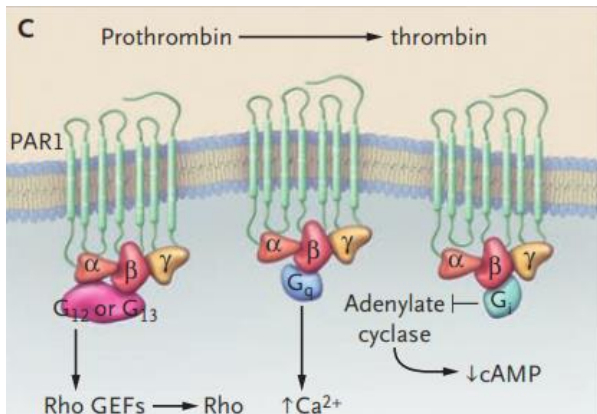


Figure 40 : La thrombine active les plaquettes par sa fixation aux récepteurs PAR1 et 4 (Davi et Patrono, 2007).

également un rôle d'activateur plaquettaire puissant (Figure 40), notamment par l'activation de ses récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, que sont PAR1 et PAR4 (Protease Activated Receptor) (Coughlin et al., 2000).

II.E.3.1.1.4 Agrégation

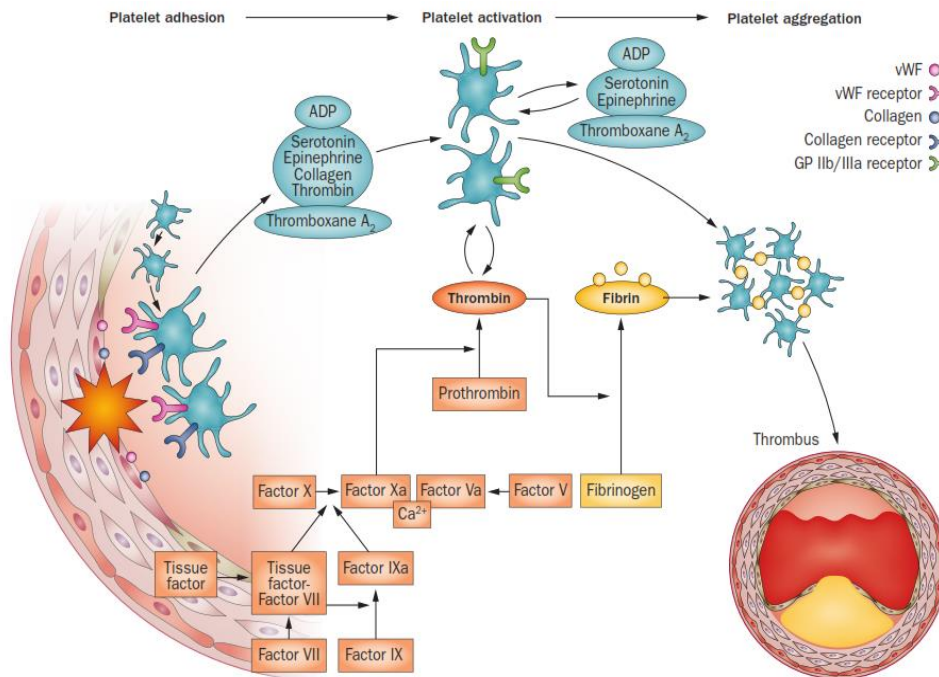


Figure 41 : Mécanismes de formation du thrombus (Franchi et Angiolillo, 2015).

Elle s'effectue en présence de calcium via la création de ponts entre la forme active de l'intégrine α IIb β 3 exprimée à la surface des plaquettes et des ligands extracellulaires que sont le fibrinogène et le facteur de vW. Cette interaction plaquette-plaquette va conduire à la formation d'un thrombus instable.

II.E.3.1.2 Hémostase secondaire (coagulation)

La stabilisation du caillot, appelée hémostase secondaire ou coagulation, est caractérisée par la consolidation de la masse plaquettaire par la fibrine. La thrombine va convertir le fibrinogène soluble, produit par le foie, en fibrine, molécule insoluble, formant un réseau de fibres de fibrine par l'intermédiaire de nombreux facteurs de la coagulation et le calcium. Douze facteurs de la coagulation participent aux étapes de la conversion du fibrinogène en fibrine. Cette cascade de réactions menant à l'activation de la fibrine peut être mise en route soit par la voie intrinsèque, soit par la voie extrinsèque. La voie intrinsèque nécessite des facteurs de coagulation qui sont présents dans le sang, alors que la voie extrinsèque ne comporte que 4 étapes et exige le contact avec le facteur tissulaire (facteur III), qui est sécrété par les CMLs, les macrophages et les cellules endothéliales.

II.E.3.2 La fibrinolyse

Une enzyme fibrinolytique, la plasmine, va dissoudre le caillot. Cette enzyme est sécrétée par le foie sous forme inactive, le plasminogène, qui sera activée par une cascade de facteurs, dont le facteur XII (facteur de Hageman) qui joue un rôle central, ou par l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA).

II.E.3.3 Les plaquettes

II.E.3.3.1 Rôle dans l'inflammation

Les plaquettes interagissent avec les leucocytes et les cellules endothéliales par différents mécanismes, soit directement, par l'interaction de la P-sélectine avec son contre-récepteur PSGL-1 exprimé à la surface de la plupart des leucocytes, soit de manière indirecte, par la sécrétion de médiateurs chimiques. Par exemple, les granules α via la sécrétion de PF4 (platelets factor 4) vont réguler l'activation des lymphocytes T, libérant des médiateurs pro-inflammatoires connus (RANTES, SDF-1...), jouant un rôle important dans l'activation et le recrutement des cellules de l'immunité, mais également dans l'activation des cellules endothéliales (Koupenova et al., 2018).

De par leur rôle dans le processus inflammatoire, les plaquettes sont impliquées dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose. En effet, des études menées chez la souris ont montré que les plaquettes contribuent à la formation des plaques par l'adhésion de celles-ci au facteur de vW exprimé à la surface des cellules endothéliales, activant l'endothélium vasculaire (Massberg et al., 2002), et accélérant ainsi la progression des lésions (Praticò et al., 2001). Il semblerait, chez la souris ApoE^{-/-}, que ce phénomène soit en partie médié par l'expression de la P-sélectine au sein des plaquettes activées (Huo et al., 2003). En effet, la signalisation par la P-sélectine stimulerait la production par les monocytes et les macrophages de médiateurs chimioattractants et de facteurs de croissance. Enfin, il a été suggéré que l'interaction prolongée entre les monocytes et les plaquettes via la P-sélectine et son récepteur PSGL1, induirait une augmentation de l'expression de l'IL-1β (Figure 42).

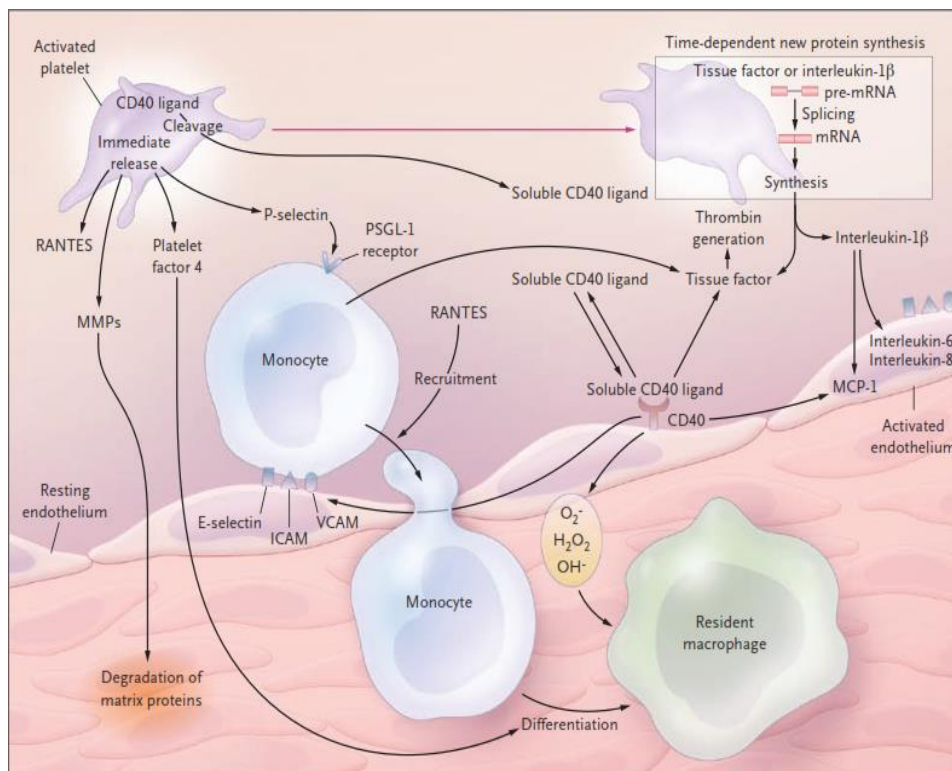


Figure 42 : Rôle des médiateurs plaquettaire dans la réponse inflammatoire. L'activation plaquettaire libère des médiateurs de l'inflammation (CD40L, PF4, RANTES, P-selectine, MMPs) activant les CE et certains leucocytes (Davi et Patrono, 2007).

Le thrombus peut se résorber de manière naturelle (thrombolyse physiologique). En revanche, dans un certain nombre de cas, celui-ci peut être incorporé à la lésion initiale, et contribuer à la croissance de la plaque. La formation d'un thrombus non occlusif peut résulter de la rupture d'une plaque ou de son érosion, on parle alors de plaque silencieuse avec formation d'un thrombus organisé, composé d'infiltration de CMLs, de protéoglycanes et de collagène. Ces lésions donneront lieu à la formation de plaques fibreuses (Naghavi et al., 2003) (Figure 43). En moyenne, un individu présente 2,4 épisodes de thrombose coronaire décrits comme des évènements mineurs non occlusifs (silencieux), mais contribuant au rétrécissement de la lumière d'une artère coronaire (Mann et Davies, 1999). Ces lésions sont retrouvées plus fréquemment chez les patients présentant des lésions coupables de type plaque stable (80%), puis suivies par les ruptures aiguës (75%), et les érosions de plaque (9%) (Burke et al., 2001).

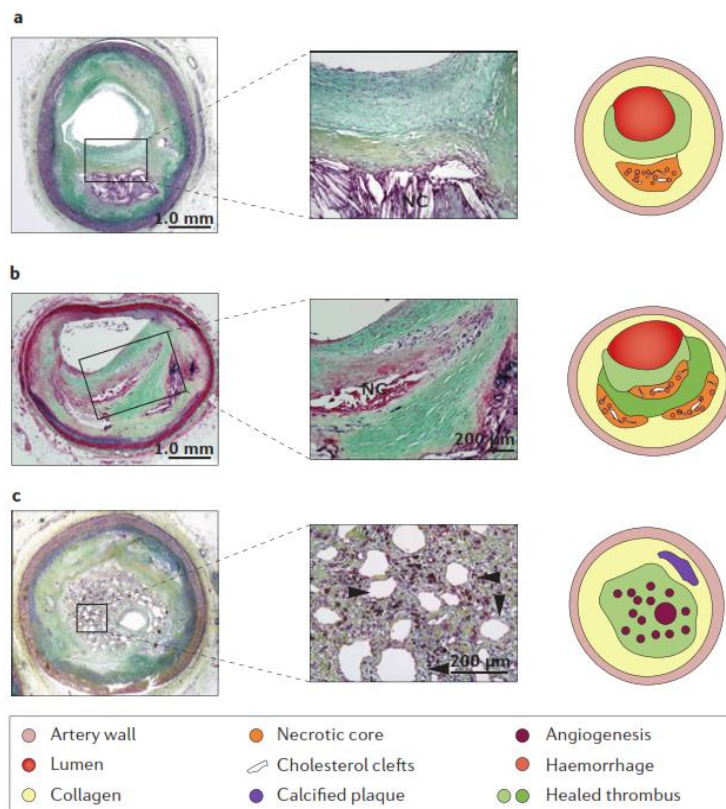


Figure 43 : La rupture et la cicatrisation épisodiques peuvent provoquer des occlusions chroniques totales. Incorporation d'une monocouche (A) ou de multiples couches de thrombus (B). Occlusion totale chronique (C) (Yahagi et al., 2015).

L'athéromatose, responsable de la majorité des événements cardiovasculaires aigus, est induite la plupart du temps par la rupture/fissure ou l'érosion d'une plaque vulnérable. Les plaques sujettes à la rupture ont pour caractéristiques principales une fine chape fibreuse, un cœur nécrotique et lipidique de grande taille et la présence de nombreuses cellules de l'immunité. Le processus inflammatoire est considéré comme le critère de vulnérabilité le plus pertinent pour caractériser ces plaques vulnérables sujettes à la rupture. La mise en contact des éléments du sang avec les molécules pro-thrombogènes de la plaque (facteur tissulaire, collagène...) vont entraîner dans un premier temps la formation d'un thrombus plaquettaire (hémostase primaire), et dans un deuxième temps, celui-ci sera consolidé par l'activation de facteurs de coagulation responsables de la stabilisation du caillot (hémostase secondaire). Dans la plupart des cas, un phénomène de thromolyse physiologique (fibrinolyse) va résorber ce caillot et donnera lieu à une rupture de plaque dite asymptomatique (silencieuse), avec une partie significative du thrombus qui sera incorporée à la plaque, contribuant à sa croissance. En revanche, en cas de thrombus occlusif, si celui-ci occupe partiellement la lumière du vaisseau, on parlera d'un SCA de type NSTEMI ou d'angor instable, alors que si celui-ci oblitère complètement la lumière de l'artère coronaire, on parlera d'un SCA de type STEMI.

III THERAPIES

Ces nouvelles connaissances sur la physiopathologie de l'athérosclérose ont permis de développer des thérapies ciblant les différents processus concernés et qui s'articulent autour de 2 axes : les lipoprotéines et l'inflammation.

III.A Les lipoprotéines

III.A.1 Réduction du taux de LDL-C

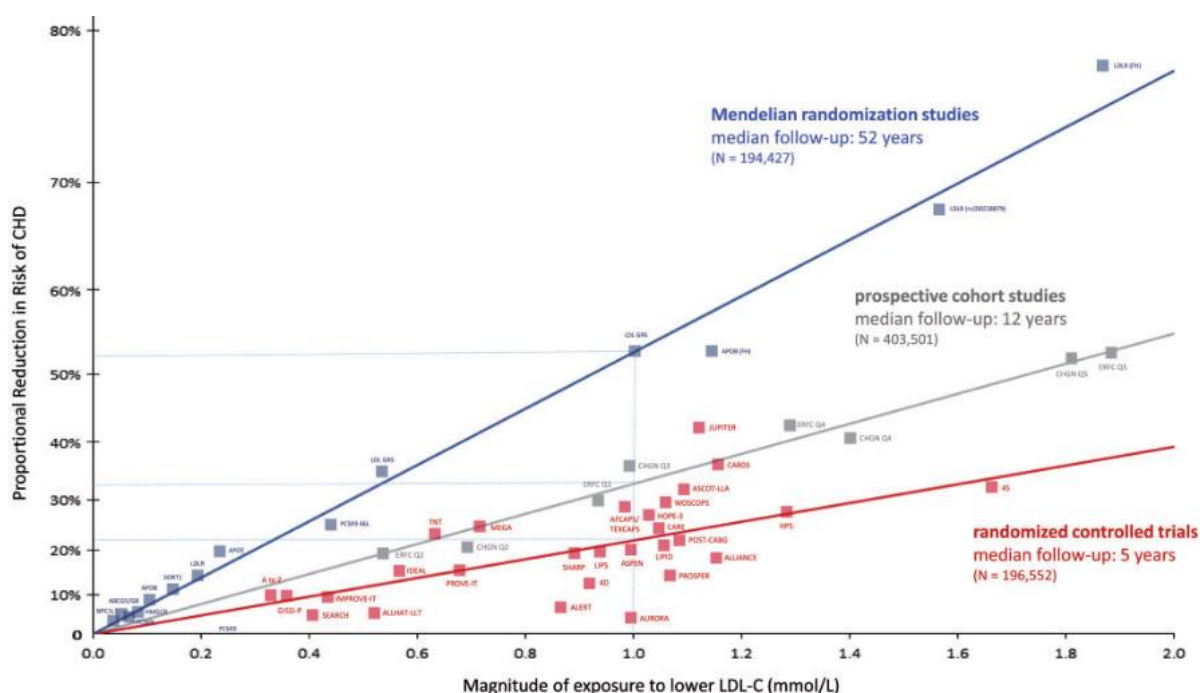
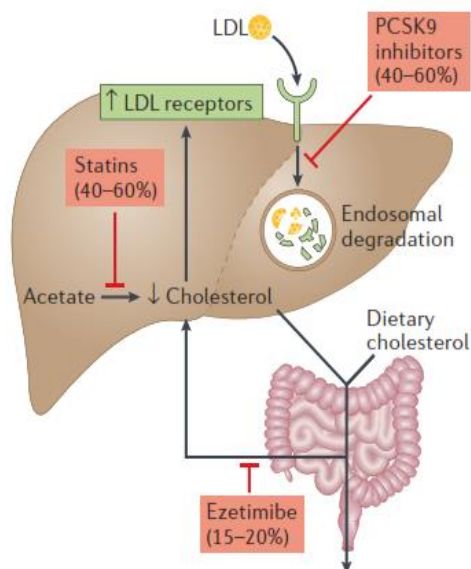


Figure 44 : Association log-linéaire entre la variation du taux de LDL-C et le risque de MCV rapporté dans des études randomisées mendéliennes (bleu), des études prospectives (gris) et des essais cliniques randomisés (rouge) (Ference et al., 2017).

L'hypothèse lipidique représente le concept selon lequel l'infiltration du cholestérol serait le facteur déclenchant du développement de l'athérosclérose. Cette hypothèse suppose que la réduction du taux de LDL-C pourrait entraîner une diminution proportionnelle du risque d'évènements cardiovasculaires. De nos jours, de nombreuses études supportent celle-ci. Une méta-analyse incluant plus de 130 000 patients dans 22 essais cliniques randomisés évaluant l'effet des statines, appelée "Cholesterol Treatment Trialists" (CTT), a montré, chez des patients avec un risque d'évènements cardiovasculaires à 5 ans inférieur à 10%, une réduction absolue d'évènements cardiovasculaires de 11 pour 1000 sur 5 ans pour chaque diminution d'1 mmol/l de LDL-C (Cholesterol Treatment Trialists'

(CTT) Collaborators, 2012). Ce lien de causalité entre LDL-C et pathologies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose s'appuie également sur de nombreuses études randomisées mendéliennes, qui ont montré une relation dose dépendante entre les concentrations de LDL-C et le risque de pathologies cardiovasculaires (Figure 44). Il a été montré qu'une diminution du taux de LDL-C de 1 mmol/l par an pendant 5 ans diminuerait le risque d'accidents vasculaires majeurs (IM, AVC, procédures de revascularisation coronarienne) de 20% (Collins et al., 2016). Cette diminution ne semblerait pas présenter de valeur seuil puisque de nombreux essais cliniques ont montré que des réductions du taux de LDL-C en dessous des taux recommandés permettaient de diminuer d'autant plus le risque de complications cardiovasculaires ("the lower the better") (Jarcho et Keaney, 2015). De plus, une réduction du taux de LDL-C au long terme, liée à des dispositions génétiques, est associée à une réduction 3 fois plus importante du risque de maladie coronaire pour chaque diminution de 1 mmol/l de LDL-C en comparaison de patients traités aux statines sur une période plus courte (Ference et al., 2012).



Différentes stratégies ont été développées afin de réduire le taux de LDL-C, soit en inhibant la production de cholestérol endogène (statines), soit en inhibant l'absorption intestinale de cholestérol (Ezétimibe), soit en ciblant une protéine impliquée dans le recyclage des récepteurs aux LDL (anti-PCSK9) (Figure 45).

Figure 45 : Mécanismes d'action des différentes thérapies réduisant le taux de LDL-C. Les statines inhibent la synthèse de cholestérol hépatique, l'ézétimibe bloque l'absorption intestinale du cholestérol et les inhibiteurs des PCSK9 bloquent la dégradation des LDLR (Grundy, 2016).

III.A.1.1 Statines

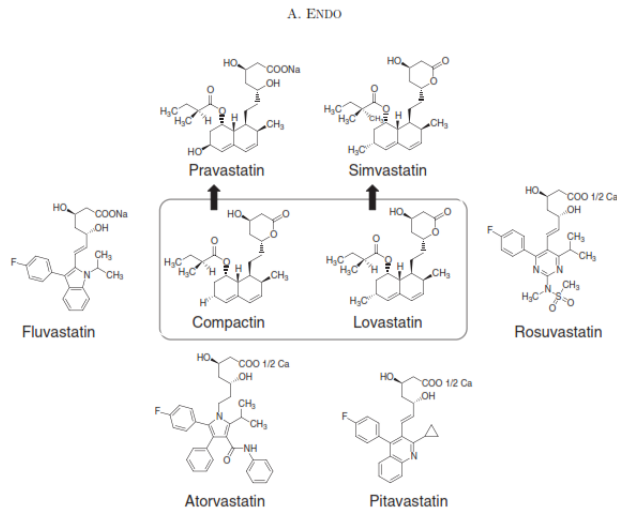


Figure 46 : Depuis la mise sur le marché de la lovastatine, 6 statines dont 4 synthétiques (fluvastatine, athorvastatine, rosuvastatine et pitavastatine) et 2 semi-synthétiques (simvastatine et pravastatine) ont été commercialisées (Endo, 2010).

Les statines sont les médicaments de première intention dans le traitement des dyslipidémies et des maladies cardiovasculaires. Découvertes en 1976 par Endo et al. (Endo, Kuroda, et Tsujita, 1976), la Compactine fut le premier composé thérapeutique appartenant à la classe des statines. Extraite à partir d'un champignon (*Penicillium*), cette molécule a entraîné une réduction du taux de cholestérol chez le poulet, le lapin et le chien (Tsujita

et al., 1979). Elle agit sur une enzyme impliquée dans la synthèse endogène du cholestérol, l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA) qui catalyse la réaction de conversion de l'HMG-CoA en mévalonate. Chez l'homme, cette molécule a été la première à entraîner une réduction de plus de 30% du taux de cholestérol chez des patients ayant une hypercholestérolémie familiale homozygote (Haba et al., 1981). Néanmoins, des suspicions de lymphomes malins chez le chien ont provoqué l'arrêt de son développement. D'autres composés analogues à la Compactine ont par la suite été découverts, comme la Lovastatine, en 1979. Depuis, 6 statines ont été commercialisées et sont toutes des analogues de la Compactine, possédant des structures similaires à l'HMG-CoA (Figure 46). En inhibant la voie endogène de synthèse du cholestérol, les statines stimulent indirectement l'expression de gènes codant pour le récepteur aux LDL, permettant l'élimination par les hépatocytes des lipoprotéines composées d'apolipoprotéine B ou E.

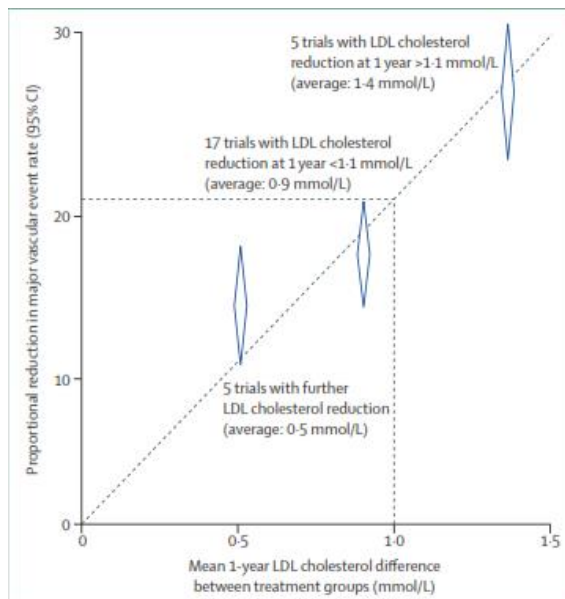


Figure 47: Réduction proportionnelle du risque d'évènement cardiovasculaire en fonction de la diminution absolue du taux de LDL-C dans différents essais cliniques randomisés (Collins et al., 2016).

Les nombreuses études cliniques réalisées sur ces inhibiteurs de la HMG-CoA réductase ont montré qu'une réduction du taux de LDL-C supérieure à 0,5 mmol/l/an était associée à une réduction du risque cardiovasculaire (Figure 47). Par exemple, la réduction du taux de LDL-C par la prise de statines pendant 5 ans chez 10 000 patients préviendrait la survenue d'évènement cardiovasculaire chez 1000 (10%) patients à haut risque (prévention secondaire) et 500 à faible risque cardiovasculaire (prévention

primaire) (Collins et al., 2016). Les études MIRACL et PROVE-IT ont également mis en évidence l'effet bénéfique de l'administration à de fortes doses de statines en prévention secondaire, chez des patients présentant un SCA (Schwartz et al., 2001 ; Cannon et al., 2004).

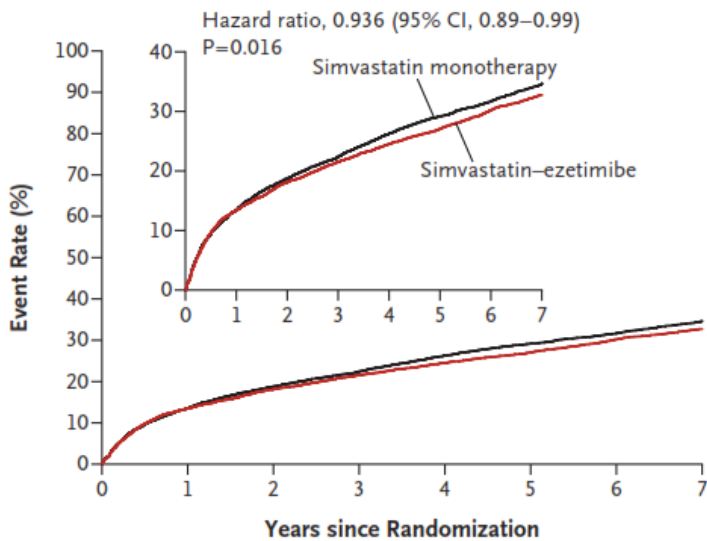
Les dernières lignes directrices de l'ESC recommandent de traiter aux statines tous patients présentant un risque d'IM ou d'AVC >7,5%, permettant ainsi de réduire de 450 000, le nombre d'évènements sur 10 ans (Stone et al., 2014).

Effets secondaires : 5 à 20 personnes sur 100 présenteront différents symptômes comme des douleurs musculaires, une fatigue, un dysfonctionnement cognitif ou un risque augmenté de diabète. Pour ces patients intolérants aux statines, ou pour ceux dont la réduction du taux de cholestérol n'est pas suffisante, d'autres thérapies hypocholestérolémiantes ont été développées.

III.A.1.2 Ezétimibe

Pour les patients sous statines n'atteignant pas les valeurs de LDL-C proposées dans les dernières recommandations, des stratégies alternatives existent afin de réduire le taux de cholestérol. L'une d'entre elles consiste à prescrire en combinaison aux statines de l'ézétimibe.

L'ézétimibe est un inhibiteur de l'absorption intestinale et biliaire du cholestérol par blocage du transporteur aux stérols, le "Nieman Pick C1 Like 1" (NPC1L1), exprimé par les hépatocytes et les entérocytes (Figure 44). Davis et al. ont montré chez des souris ApoE^{-/-} que l'ézétimibe permet de diminuer de manière conséquente le taux de cholestérol (-61%), avec pour conséquence une réduction de la surface des lésions athéromateuses (Davis et al., 2001). De nombreuses études précliniques ont par la suite confirmé ces observations (Davis, Lowe, et Neff, 2011). Chez l'homme, il a été mis en évidence dans une étude randomisée mendélienne, chez les participants porteurs de mutations (1/650 participants) inactivant le gène codant pour la protéine NPC1L1, une réduction significative du taux de LDL-C associée à une diminution du risque d'évènement cardiovasculaire chez des patients coronariens en comparaison du groupe contrôle non porteur de ces variants génétiques (Myocardial Infarction Genetics Consortium Investigators et al., 2014). L'administration d'ézétimibe à 10 mg/j chez des patients hypercholestérolémiques a permis de réduire de 50% l'absorption intestinale du cholestérol (Sudhop et al., 2002), entraînant une diminution du taux de LDL-C comprise entre 10 et 20% en comparaison de patients recevant un placebo (Ezzet et al., 2001). Aucun essai clinique randomisé n'avait pu mettre en évidence d'effets cardioprotecteurs de l'ézétimibe jusqu'à la publication de l'étude IMPROVE-IT (IMProved Reduction of Outcomes: Vytorrin Efficacy International Trial) (Cannon et al., 2015). L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet en prévention secondaire de l'association de l'ézétimibe (10 mg/j) à la Simvastatine (40 mg/j) sur la survenue d'évènements cardiovasculaires (décès cardiovasculaires, IMA non fatal, angor instable, revascularisation coronaire, AVC non fatal) chez 18 144 patients coronariens avec un taux de LDL-C \leq 1,25 g/l.



No. at Risk	0	1	2	3	4	5	6	7
Simvastatin-ezetimibe	9067	7371	6801	6375	5839	4284	3301	1906
Simvastatin	9077	7455	6799	6327	5729	4206	3284	1857

Figure 48 : Effet de l'ézétimibe en association à la Simvastatine sur le critère primaire composite comprenant l'AVC non fatal, l'évènement coronarien majeur et le décès d'origine cardiovasculaire (Cannon et al., 2015).

Après un suivi médian d'environ 6 ans, une réduction de 6,4% du risque du critère de jugement principal (décès cardiovasculaires, IMA non fatal, angor instable, revascularisation coronaire, AVC non fatal) a été observée pour le groupe Ezétimibe (10 mg/j) + Simvastatine (40 mg/j)

en comparaison du groupe Simvastatine seule, représentant une réduction de 2 points du risque absolu (Figure 48). Cette étude a été la première à avoir mis en évidence l'intérêt de réduire le taux de LDL-C au-delà des valeurs recommandées (Jarcho et Keaney, 2015). En revanche, aucun bénéfice sur la mortalité n'a été observé.

Son effet sur la plaque d'athérome a été démontré dans l'étude PRECISE-IVUS, publiée en 2015 dans le "Journal of American College of Cardiology", dans laquelle l'association de l'Ezétimibe à l'atorvastatine a amélioré la régression des plaques chez des patients "stentés" en comparaison de patients sous statines uniquement (Tsujita et al., 2015). De plus, l'effet de cette bithérapie a été plus efficace chez les patients atteints d'un SCA en comparaison de coronariens stables, suggérant que l'Ezétimibe pourrait constituer une option efficace chez les patients à haut risque cardiovasculaire.

III.A.1.3 PCSK-9 (Protein convertase subtilisin/kexin 9)

Le gène codant pour la protéase à serine PCSK9 a été découvert en 2003 par Boileau C et Seidah NG (Abifadel et al., 2003). Principalement synthétisée par le foie, cette protéine se lie au récepteur aux LDL, induisant leur dégradation, et modulant ainsi la concentration en cholestérol contenu dans les lipoprotéines

riches en apolipoprotéine B. En inhibant l'action de cette protéase, l'expression des récepteurs aux LDL et leur activité sont augmentées, conduisant à la réduction du taux de LDL-C et VLDL-C circulant (Figure 45). L'efficacité et l'innocuité de différents anticorps monoclonaux humains (Evolocumab, Alirocumab) dirigés contre la protéine PCSK9 ont été validés dans plusieurs études cliniques (OSLER 1-2, ODYSSEY). Ces deux médicaments ont récemment (2015) reçu l'autorisation de mise sur le marché par les agences américaine (FDA) et européenne (EMA) chez des patients : (i) à haut risque cardiovasculaire présentant une hypercholestérolémie familiale hétérozygote, traités aux statines, (ii) à haut risque cardiovasculaire pour qui les statines n'ont pas permis d'atteindre la valeur cible de LDL-C, ou intolérants. En outre, l'Evolocumab a été approuvé par la FDA pour le traitement des hypercholestérolémies familiales homozygotes en association avec les statines et en monothérapie dans la réduction du risque d'IMA, d'AVC et de revascularisation coronaire chez des patients présentant une maladie cardiovasculaire documentée. L'étude GLAGOV, portant sur 968 coronariens nécessitant une angiographie et traités par Evolocumab en association avec une statine pendant 18 mois, a permis de démontrer son efficacité sur la plaque d'athérome, avec une diminution significative du volume des plaques déterminé par "intravascular ultrasound" (IVUS) (Nicholls et al., 2016). L'étude FOURIER (Further Cardiovascular Outcomes Research with PCSK9 inhibition in subjects with Elevated risk) a quant à elle pu mettre en évidence l'effet bénéfique d'un traitement conjoint de l'atorvastatine et de l'Evolocumab sur le risque d'événements cardiovasculaires chez des patients coronariens stables (Sabatine et al., 2017). Ces études confirment l'idée selon laquelle plus le taux de LDL-C est bas, plus le risque cardiovasculaire est diminué ("the lower the better"). Toutefois, la réduction absolue du critère de jugement primaire dans l'étude ODYSSEY, tout comme dans l'étude FOURIER, a été assez faible, avec seulement 1,5% et 1,6% respectivement. Au vu de son coût relativement élevé (environ 2 000 euros/an) et de son effet assez modéré sur la réduction du risque cardiovasculaire, des questions demeurent quant à son utilisation en pratique clinique.

D'autres anti-PSK9 ont été arrêtés, comme le Bococizumab qui contrairement à l'Evolocumab et à l'Alirocumab, est un anticorps monoclonal humanisé. Dans le

programme SPIRE (study of PCSK9 inhibition and the reduction of vascular events), deux essais cliniques (SPIRE-1 et SPIRE-2) ont été réalisés dans le but d'évaluer l'innocuité et l'efficacité chez des patients à haut risque cardiovasculaire ou présentant une maladie cardiovasculaire. Les essais cliniques ont été stoppés avant la fin de l'étude en raison d'une immunogénicité importante, d'une réaction aux sites d'injection chez plus de 10% des participants, et d'une variabilité dans la réduction du taux de LDL-C élevée (Ridker et al., 2017).

Afin de réduire son coût et dans la perspective d'un traitement à long terme, des chercheurs ont évalué l'effet thérapeutique d'un vaccin (AT04A) anti PCSK-9 chez des souris ApoE^{-/-}*3LeidenCETP (souris présentant un profil lipidique humanisé) (Landlinger et al., 2017). Les résultats de cette étude ont été très prometteurs, avec une réduction du taux de LDL-C associée à une diminution de l'inflammation systémique et vasculaire, et une diminution de la surface des lésions athéromateuses. L'efficacité à long terme de cette stratégie nécessite de plus amples investigations.

Un "small interferon RNA" (siRNA), dénommé Inclisiran, a été développé afin d'inhiber la synthèse de PCSK9 (Fitzgerald et al., 2017). Cet siRNA est conjugué à un groupement acétylgalactosamine, lui permettant d'être internalisé spécifiquement par les hépatocytes et d'inhiber la traduction de l'ARNm de la PCSK9. L'étude de phase II ORION-1, incluant environ 500 patients présentant des antécédents de maladie cardiovasculaire et un taux élevé de LDL-C (>70 mg/dl), a montré un effet optimal du traitement par deux injections sous-cutanées effectuées tous les 3 mois de 300 mg d'Inclisiran, induisant une réduction du taux de LDL-C de 50% à un mois, et de 40% à 8 mois (Ray et al., 2017).

Effets pléiotropes

PCSK9 n'est pas seulement exprimé par les hépatocytes. Cette protéase à sérine est également produite et sécrétée par les CEs, les CMLs et les macrophages. De nombreuses études précliniques suggèrent divers rôles anti-athérogènes et anti-inflammatoires des inhibiteurs de PCSK9 médiés par différents mécanismes tels que l'inhibition de l'activation des CEs et des CMLs, la réduction du stress oxydatif et de l'inflammation, l'inhibition de la migration et de la différenciation

des CMLs, et la réduction de l'apoptose des macrophages et des CMLs (Karagiannis et al., 2018). Une étude clinique de phase III, dénommée ANITSCHKOW, dont les critères d'inclusion comprennent en partie un taux de lipoprotéines (a) (lp[a]) élevé et un "target to background ratio" (TBR) carotidien ou au niveau de l'aorte thoracique élevé (>1,6) (NCT02729025), s'attachera à évaluer l'effet de l'Evolocumab sur l'inflammation vasculaire par l'imagerie du FDG (PET/CT).

III.A.1.4 ANGPTL3 (angiopoietin-like 3)

La protéine ANGPTL3 a été établie comme un régulateur clé du métabolisme des lipides, et exerce une action inhibitrice sur la lipoprotéine lipase (LPL), faisant de cette molécule une cible thérapeutique à fort potentiel dans le traitement de la maladie coronaire. Il a été montré, chez de rares personnes qui présentent des variants génétiques avec perte de fonction d'ANGPTL3, une réduction du taux de LDL-C et de triglycérides (Helgadottir et al., 2016). Dans une étude récemment publiée dans le NEJM, parmi des patients sans maladie coronaire documentée, 0,45% d'entre eux possédaient une mutation "perte de fonction" d'ANGPTL3, en comparaison des 0,33% chez les coronariens, démontrant l'intérêt de cibler cette protéine dans la réduction du risque cardiovasculaire. Dans cette même étude, 9 patients avec une hypercholestérolémie familiale homozygote sous traitement hypolipidémiant intensif (Statines, Ezétimibe) ont vu leur taux de LDL-C diminuer de 49% pour le groupe traité par un anticorps monoclonal dirigé contre Angptl3, l'Evinacumab, en comparaison du groupe placebo (Dewey et al., 2017).

Une autre stratégie visant à inhiber cette molécule a été utilisée, et consiste en l'injection d'ARN anti-sens. Après avoir démontré son intérêt chez la souris, elle a été injectée à différentes doses à 44 volontaires qui ont vu leur taux de LDL-C et de VLDL-C diminuer de 33% et 60% respectivement (Graham et al., 2017). Des études de phase II et III ont été initiées afin d'évaluer l'innocuité et l'efficacité à long terme de ce nouvel agent thérapeutique chez des patients présentant une hypercholestérolémie familiale hétérozygote associée à des antécédents cardiovasculaires (NCT03175367), et chez des patients avec une hypercholestérolémie familiale homozygote (NCT0339978).

Les résultats de ces différentes études cliniques évaluant l'effet d'agents thérapeutiques hypocholestérolémiant sur le risque d'évènement

cardiovasculaire suggèrent que le bénéfice apporté par ces thérapies résulte essentiellement de l'amplitude absolue de réduction du taux de LDL-C indépendamment des mécanismes par lesquels elle est obtenue (FERENCE et al., 2015).

Les aphérèses

L'aphérèse est un procédé permettant l'élimination de certains composés du sang par circulation extra-corporelle. Ainsi, la LDL-C aphaérèse permet de réduire le taux de LDL-C chez les patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale homozygote. Elle doit être répétée toutes les 2 à 4 semaines. Elle est prescrite aux patients à haut risque cardiovasculaire, en prévention secondaire, intolérants aux thérapies hypocholestérolémiantes.

III.A.2 HDL

De nombreuses études épidémiologiques ont montré une relation inverse entre le taux de HDL-C et le risque de maladie cardiovasculaire (Barter et al., 2007). Les HDL sont les principales molécules impliquées dans le transport inverse du cholestérol, voie anti-athérogène, qui est défini par le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie (Figure 49). Différentes approches thérapeutiques ciblant spécifiquement cette lipoprotéine ont été développées.

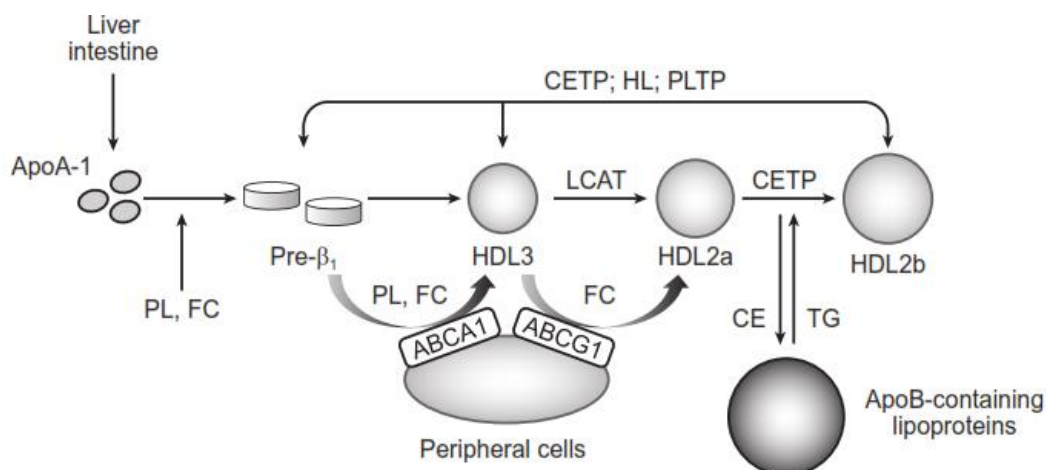


Figure 49 : Génération des HDL. La sécrétion par le foie de l'ApoA-1 associée aux phospholipides et au cholestérol libre non estérifié donne naissance à la formation de pré-β HDL. Le cholestérol libre non estérifié et les phospholipides vont être transférés des cellules vers les HDL via l'ABCA1, qui va promouvoir l'efflux de cholestérol cellulaire. ABCG1 et le SR-B1 contribuent également à ce transfert de cholestérol. L'estérification du cholestérol par la "lecithin-cholesterol acyltransferase" (LCAT) est le processus clé durant le transport inverse du cholestérol, transformant les HDL discoïdales en HDL sphériques α. Sous l'effet de la "cholesteryl ester transfer protein" (CETP), échangeant des esters de cholestérol contre des triglycérides présents dans les lipoprotéines composées d'ApoB, les HDL matures vont augmenter en taille, passant de HDL2a en HDL2b. La CETP, la "phospholipid transfer protein" (PLTP) et l'"hepatic lipase" (HL) vont générer des petites particules préβ à partir des larges particules α (Karathanasis et al., 2017).

III.A.2.1 Niacines (acide nicotinique)

Les niacines ont été la première classe thérapeutique approuvée dans le traitement des dyslipidémies. Les niacines diminuent le taux de lipoprotéines pro-athérogènes, incluant les LDL-C, les triglycérides, et les lp(a), et ont été associées à une réduction du risque d'évènements cardiovasculaires (IMA, revascularisation et AVC), sans effet bénéfique sur le taux de mortalité toutes causes (Canner et al., 1986). Leurs mécanismes d'action restent peu compris. Il semblerait que la niacine agisse en inhibant la mobilisation des acides gras libres par les adipocytes, entraînant une réduction du taux de triglycérides présents au sein des LDL et VLDL, provoquant également une augmentation du taux de HDL et suggérant une action inhibitrice sur la "cholesteryl ester transfer protein" (CETP) (Song et FitzGerald, 2013). En revanche, les effets secondaires sont nombreux et peuvent se manifester par des bouffées de chaleur, des rougeurs du visage, des maux d'estomac, et des démangeaisons. De plus, la niacine induirait une hyperglycémie et augmenterait le taux d'acide urique.

III.A.2.2 Les Fibrates

L'hypertriglycéridémie (>150 mg/dl) associée à un faible taux de HDL (<1 mmol/l) est un facteur de risque cardiovasculaire important chez des patients ne présentant pas d'élévation du taux de LDL-C (Chapman et al., 2011). Les Fibrates sont une classe d'hypolipidémiants qui inclut le clofibrate, le Gemfibrozil, le Fénofibrate, le Bézafibrate et le Ciprofibrate. Leur mécanisme d'action est médié par l'activation du récepteur nucléaire, PPAR α ("Peroxisome Proliferator-activated receptor α "). Celui-ci forme un hétérodimère avec les récepteurs nucléaires au rétinoïde X, régulant la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines. Le suivi prolongé (9 ans) de patients ayant participé à l'étude clinique ACCORD a confirmé l'effet bénéfique sur le risque d'évènement cardiovasculaire de l'ajout d'un traitement aux Fibrates (Fénofibrate) chez des patients diabétiques de type 2, sous statines, présentant un faible taux de HDL et une hypertriglycéridémie (Elam et al., 2017). En revanche, il a été observé chez les patients traités aux Fibrates une augmentation des taux circulants de PCSK9 (Ferri et al., 2017).

L'ApoA-1 est le principal constituant fonctionnel des HDL dont des variants génétiques (ApoA-1 MILANO) ont été rapportés pour conférer aux patients porteurs une espérance de vie prolongée en dépit d'un faible taux de HDL-C et d'un taux élevé de triglycérides (Gualandri et al., 1985). Il a été montré que cette mutation induisait une augmentation de l'efflux de cholestérol ainsi qu'une action anti-inflammatoire chez le lapin (Ibanez et al., 2008). Celle-ci a été associée à une réduction de la surface des lésions athéromateuses (Shah et al., 2001).

Différentes stratégies ont été développées afin d'augmenter le taux de HDL-C, soit par l'utilisation d'ApoA1 purifiée (plasma humain), soit par l'infusion de protéines recombinantes de l'ApoA1, ou de peptides mimétiques de l'ApoA1.

Chez l'homme, la perfusion de la protéine recombinante ApoA1-Milano en combinaison avec des phospholipides a engendré une réduction du volume des lésions athéromateuses déterminées par IVUS (Nissen et al., 2003). Néanmoins, des résultats contradictoires ont été observés dans l'étude de phase II (MILANO-pilot) qui a été interrompue en raison du manque d'efficacité de ce mimétique des HDL contenant l'ApoA1-Milano (MDCO-216).

L'infusion de CSL-112 (ApoA-1 purifiée de plasma humain et reconstituée avec des phosphatidylcholines pour former des particules de lipoprotéines injectables à l'homme) a été bien tolérée chez des patients coronariens stables et a permis d'augmenter le taux d'ApoA-1 plasmatique en association avec une augmentation du taux d'efflux de cholestérol (Tricoci et al., 2015). Une phase III a débuté, dénommée AEGIS-II, et vise à évaluer l'effet de la perfusion de CSL-112 sur la réduction du risque d'évènement cardiovasculaire chez plus de 17 000 participants diagnostiqués avec un SCA (Gille et al., 2018). CER-001 est également un mimétique des particules d'HDL naissantes (pré β -HDL) dont l'effet bénéfique sur le taux de lipides et sur la régression du volume de plaque carotidienne, chez des patients présentant une hypercholestérolémie familiale homozygote, a été prouvé dans l'étude MODE (Hovingh et al., 2015). En revanche, aucun effet bénéfique n'a été rapporté chez des patients présentant une maladie coronaire.

Les mutations de type perte de fonction du gène de la CETP ont été associées à une augmentation du taux de HDL faisant de cette protéine une cible potentielle dans le traitement de la maladie coronaire (Inazu A et al., 1990). La CETP permet le transfert d'esters de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines composées de l'ApoB, entraînant une réduction du taux de HDL-C. Les premières études sur ces inhibiteurs ont montré une augmentation du taux de HDL-C, et dans certains cas une réduction également du taux de LDL-C. Au vu des modulations importantes induites par ces inhibiteurs sur le taux d'HDL-C, un effet anti-athérogène notable était attendu. Néanmoins, le premier essai clinique de grande ampleur évaluant l'effet du Torcetrapib sur le risque d'évènement cardiovasculaire n'a pas mis en évidence l'effet escompté. En effet, celui-ci a augmenté la mortalité toutes causes et le risque d'évènement cardiovasculaire (Barter et al., 2007). D'autres essais cliniques, évaluant l'effet cardioprotecteur du Dalcatrapib (Schwartz et al., 2012) ou de l'Evacetrapib (Lincoff et al., 2017), ont été interrompus prématurément pour cause d'efficacité insuffisante. Seul l'Anacetrapib a montré un effet bénéfique sur le risque cardiovasculaire. Dans l'étude REVEAL où plus de 30 000 patients, déjà sous traitement aux statines, ont été recrutés, l'Anacetrapib a réduit de manière significative le risque d'évènement cardiovasculaire (The HPS3/TIMI55-REVEAL Collaborative Group., 2017).

III.B Inflammation

De multiples études expérimentales et cliniques ont mis en évidence le rôle de l'inflammation dans l'athérosclérose et ses complications (Ross, 1999). Ridker et al. ont montré en 2003, que les taux de CRP ultrasensibles corrélaient fortement au risque de complication cardiovasculaire (Ridker, 2003), permettant d'affiner la prédiction du risque d'évènement cardiovasculaire déterminée sur la base de scores de risques conventionnels (The Emerging Risk Factors Collaboration, 2012). La CRP est produite par les hépatocytes dans la phase aiguë de l'inflammation, sous l'induction de l'IL-6, elle-même stimulée à partir de la production d'IL-1 β . Des sécrétions extra-hépatiques ont également été observées par les neurones dans la maladie d'Alzheimer, et par les cellules musculaires

lisses au sein des plaques d'athérosclérose (Calabro, 2003). Malgré les progrès réalisés dans la prise en charge des patients ayant été victimes d'un IM, un patient sur cinq récidive dans l'année qui suit (Jernberg et al., 2015). Afin de répondre à cette problématique, de nouvelles thérapies, plus ciblées, sont en cours d'évaluation, en particulier celles agissant sur l'inflammation (Ridker, 2014) (Figure 50).

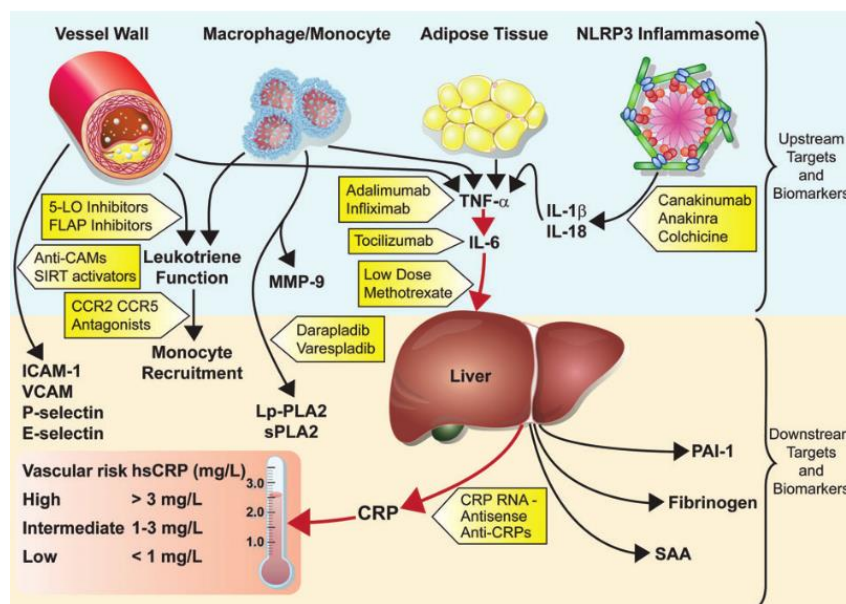


Figure 50 : Les voies de signalisation de l'inflammation comme cibles thérapeutiques dans le traitement des maladies cardiovasculaires (Ridker, 2014).

Les statines ont été la première classe thérapeutique de médicaments à suggérer un rôle cardioprotecteur des thérapies ciblant le processus inflammatoire.

Effets pléiotropes des statines

La CRP est un biomarqueur prédictif indépendant de la survenue d'évènement cardiovasculaire (Ridker, 2003). L'étude JUPITER, pour "Justification of Use of Statin in Primary Intervention : Prevention an international trial evaluating Eosuvastatin", avait pour objectif de tester l'hypothèse selon laquelle une élévation des taux de CRP (>2 mg/l) permettait d'identifier un groupe de la population non admissible à un traitement aux statines en prévention primaire (LDL-C < 130 mg/dl), mais pour qui ce traitement aurait pu avoir des effets cardioprotecteurs. Dans cette étude, la Rosuvastatine a diminué de 44% le risque du critère de jugement primaire (décès cardiovasculaire, AVC et IM non fatals, procédures de revascularisation et angor instable) en comparaison du groupe placebo chez des patients avec une CRP>2 mg/l et un taux de LDL-C <130 mg. D'après les auteurs de cette étude, cet effet bénéfique serait

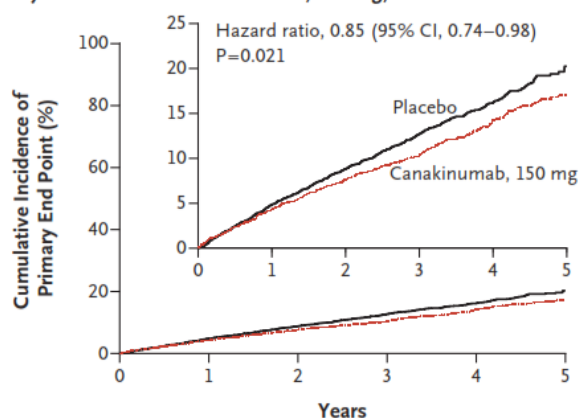
imputable à la diminution conjointe du taux de LDL-C et de la concentration en CRP (Ridker et al., 2008), suggérant un potentiel effet favorable d'un traitement anti-inflammatoire sur le risque cardiovasculaire.

Ces effets pléiotropes sont essentiellement médiés par l'inhibition de la synthèse des intermédiaires du mévalonate, en particulier du farnésyl pyrophosphate (FPP) et du géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP). Ces isoprénoïdes interviennent dans les modifications post-traductionnelles des petites protéines G (Ras, Rock, Rhoa) impliquées dans la signalisation de facteurs de croissance cellulaire et oxydatifs. Ces effets bénéfiques comprennent des propriétés antioxydantes, l'amélioration de la dysfonction endothéliale, l'inhibition des réponses inflammatoires et la stabilisation des lésions athéromateuses (Davignon, 2004).

III.B.1 Etude CANTOS

Aucune étude jusqu'à présent n'avait pu démontrer l'effet bénéfique direct d'une thérapie anti-inflammatoire sur le risque d'évènement cardiovasculaire.

B Primary End Point with Canakinumab, 150 mg, vs. Placebo



No. at Risk						
Placebo	3344	3141	2973	2632	1266	210
Canakinumab	2284	2151	2057	1849	907	207

Figure 51 : L'incidence cumulative du critère de jugement principal (Ridker, Everett, et al., 2017).

Cette première étude internationale (39 pays), randomisée, multicentrique en double aveugle, appelée CANTOS pour "Canakinumab Anti-inflammatory thrombotic Outcome Study", avait pour objectif d'évaluer l'effet sur le risque cardiovasculaire d'un anti-inflammatoire, le Canakinumab (anticorps monoclonal ciblant l'IL-1 β) en comparaison d'un placebo chez 10 061 patients

coronariens stables ayant un antécédent d'infarctus avec une CRP ultrasensible >2 mg/l. Le suivi de cette étude a été effectué sur 3,7 ans. Le critère de jugement principal était composite (MI non fatal, AVC non fatal et décès cardiovasculaire) et le secondaire ajouté au critère de jugement principal, était l'angor instable.

En prévention secondaire, ce traitement (150 mg) a diminué de manière significative l'incidence du critère de jugement primaire (Ridker et al., 2017) (Figure 51). En revanche, aucune réduction sur la mortalité toutes causes n'a été observée chez les patients sous traitement.

Une sous-étude de CANTOS a évalué le rôle de l'inflammation résiduelle sur le risque athérombotique. Les patients ayant le mieux répondu au traitement (3 mois après la première injection), avec une réduction du taux de CRP < 2 mg/l, ont eu une diminution significative de 25% du critère de jugement primaire et de 31% des décès (cardiovasculaires et toutes causes), en comparaison du groupe avec une CRP > 2 mg/l et chez qui l'effet n'était pas significatif (Ridker et al., 2018). Au vu de son coût annuel très élevé, environ 200 000 dollars, les résultats de cette sous-étude démontrent l'intérêt d'un traitement ciblé, administré seulement aux personnes les plus sensibles, chez qui l'effet de la thérapie sera le plus important.

Cette étude confirme pour la première fois le lien entre l'inflammation et l'athérosclérose, et ouvre la voie à de nouveaux traitements anti-inflammatoires cardioprotecteurs.

De nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le processus inflammatoire sont à l'étude et peuvent être divisées en 2 catégories. Une première catégorie d'études cherche à évaluer l'effet anti-inflammatoire indirect de thérapies conventionnelles, utilisées dans le traitement de maladies chroniques inflammatoires (Polyarthrite rhumatoïde, la maladie de la goutte...) et faisant référence à l'utilisation du méthotrexate, des statines, de la colchicine ou de l'aspirine. Concernant la deuxième catégorie, les thérapies étudiées visent à inhiber des médiateurs spécifiques de l'inflammation comme les cytokines et leurs voies de signalisation (Tousoulis et al., 2016).

III.B.2 *Les thérapies non spécifiques*

III.B.2.1 Aspirine

L'aspirine est un inhibiteur irréversible de la cyclooxygénase cox-1. Elle agit non seulement sur l'agrégation plaquettaire, mais également sur l'inflammation par l'inhibition de la production de thromboxanes et de prostaglandines. Des études menées chez la souris ApoE^{-/-} ont montré que l'aspirine diminuait les taux de

CX3CL1 (fractalkine), impliquée dans la migration des monocytes, réduisant ainsi la sévérité des lésions athéromateuses (Cyrus et al., 2002). Chez l'homme, les effets anti-inflammatoires de l'aspirine ont été observés, médiés par la réduction de cytokines pro-inflammatoires et de marqueurs de l'inflammation, tels que l'IL-6, la CRP et le M-CSF, chez des patients coronariens stables. En prévention primaire, l'aspirine a été associée à une réduction du risque d'IMA en association à la réduction du taux de CRP, suggérant un effet cardioprotecteur induit à la fois par ses effets anti-thrombotiques, ainsi que ses propriétés anti-inflammatoires (Ridker et al., 1997). Néanmoins, dans l'étude CONFIRM, l'aspirine n'a pas été associée à une réduction du risque cardiovasculaire chez des patients souffrant d'une maladie coronaire stable, en comparaison aux patients traités aux statines. Malgré ses propriétés anti-inflammatoires, les effets anti-athérogènes de l'aspirine n'ont à ce jour pas été démontrés. Une étude clinique en cours (ARRIVE, NCT00501059) va s'attacher à évaluer l'effet en prévention primaire d'un traitement à l'aspirine chez des patients présentant un risque modéré d'évènement cardiovasculaire (compris entre 20% à 30% sur 10 ans) sans antécédent cardiovasculaire.

III.B.2.2 Colchicine

La colchicine est prescrite depuis de nombreuses années pour traiter les patients atteints de maladies auto-immunes telles que la maladie de la goutte ou de la fièvre méditerranéenne familiale. Son principal mécanisme d'action anti-inflammatoire est médié par sa liaison à la tubuline, entraînant une dépolymérisation des microtubules, diminuant l'afflux leucocytaire et la phagocytose, et réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires. Dans une étude pilote réalisée chez des patients victimes d'un IMA, un traitement avec de la colchicine durant 5 jours a permis de réduire la surface sous la courbe de CK-MB (Créatine-Kinase, marqueur cardiaque dans le diagnostic et le suivi de l'IM), et la taille de la zone nécrotique déterminée par imagerie par résonance magnétique (IRM) cardiaque (Deftereos et al., 2015). L'étude LoDoCo, pour "Low Dose of Colchicine" a montré, en prévention secondaire chez des coronariens stables, que la colchicine réduisait significativement le risque d'évènement cardiovasculaire en association avec des thérapies conventionnelles (statines, aspirines, bêta-bloquant) (Nidorf, 2013). Il semblerait que la colchicine possède

également des effets anti-inflammatoires directs, via l'inhibition de l'inflammasome NLRP3, principal activateur de l'IL-1 β (Martínez, Celermajer, et Patel, 2018). Ces données suggèrent que la colchicine pourrait être une thérapie anti-inflammatoire efficace pour réduire le risque résiduel d'évènements cardiovasculaires lié à la maladie coronaire. L'essai clinique COLCOT, pour "Colchicine Cardiovascular Outcomes Trial", vise à répondre à cette hypothèse dont l'objectif principal sera de déterminer si le traitement à long terme (2 ans) par la colchicine permettra de réduire le taux de récurrence d'évènements cardiovasculaires chez des patients victimes d'IMA (NCT02551094).

III.B.2.3 Méthotrexate

Traitement immunomodulateur utilisé chez des patients atteints de maladies auto-immunes rhumatismales, comme par exemple la polyarthrite rhumatoïde, le méthotrexate est un agoniste de l'acide folique (vitamine B9), inhibant de manière non spécifique (cellules cancéreuses, saines et bactériennes) l'enzyme "dihydrofolate reductase" (DHFR). L'inhibition de cette enzyme bloque la réduction de l'acide folique (inactif), en acide tétrahydrofolique puis en acide folinique (actif), impliqué dans la synthèse des bases puriques (adénine et guanine), diminuant la prolifération des cellules. De récentes méta-analyses ont montré qu'un traitement par le méthotrexate était associé à une réduction du risque d'évènement cardiovasculaire en comparaison d'autres traitements conventionnels contre le rhumatisme, suggérant de potentiels effets athéroprotecteurs de celui-ci (Mangoni et al., 2017). Le méthotrexate présente une action anti-inflammatoire médiée par l'inhibition de l'inflammasome NLRP3, mais également de cytokines clés de l'inflammation comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , de manière directe ou indirecte par l'activation de récepteurs à l'adénosine et/ou de l'AMPK ("adenosine monophosphate-activated protein"). Un essai clinique en cours, "Cardiovascular Inflammation Reduction Trial" (CIRT) vise à évaluer l'effet de faibles doses de méthotrexate, chez des coronariens stables, diabétiques de type 2 ou avec un syndrome métabolique, sur la réduction du critère de jugement primaire composite (IMA, AVC et décès cardiovasculaire) (Everett et al., 2013). A la différence du Canakinumab, ce médicament est un générique à faible coût qui pourrait être prescrit plus facilement, si les résultats de l'étude CIRT s'avèrent positifs.

III.B.3 *Les thérapies ciblées*

III.B.3.1 Inhibiteurs des cytokines pro-inflammatoires

Les résultats de l'étude CANTOS supportent l'idée selon laquelle l'inhibition ciblée de cytokines pro-inflammatoires serait une stratégie efficace dans la réduction du risque résiduel. La plupart de ces nouvelles stratégies visent à administrer un anticorps monoclonal dirigé contre l'une des nombreuses cytokines pro-inflammatoires jouant un rôle dans l'athérosclérose, comme par exemple le TNF- α , l'IL-6 ou le récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra). Les données cliniques suggèrent de potentiels effets cardioprotecteurs de ces différentes stratégies déjà utilisées dans le traitement de maladies auto-immunes (psoriasis). Des études en cours, portant sur l'évaluation de l'efficacité de l'Anakinra (anti-IL-1Ra), de l'Etanercept (anti-TNF- α) ou du Tocilizumab (anti-IL-6) dans la maladie coronaire, permettront de valider ou non de telles stratégies thérapeutiques (NCT01950299, NCT01722214, NCT01331837).

D'autres cibles ont également été investiguées, comme la P-sélectine, par l'administration d'un anticorps monoclonal, l'Inclacumab, dans une étude portant sur plus de 500 patients présentant un NSTEMI.

III.B.3.2 Cytokines anti-inflammatoires

L'administration de cytokines anti-inflammatoires à des fins thérapeutiques a été évaluée dans des modèles expérimentaux et les résultats semblaient prometteurs. L'administration locale au sein des lésions athéromateuses de cytokines anti-inflammatoires est possible par l'utilisation d'adénovirus. Tian Y et al. ont montré chez le rat que l'administration d'IL-19, connue pour son rôle anti-inflammatoire, induisait la production de LTh2, au phénotype anti-inflammatoire (Tian et al., 2008). De plus, des effets similaires ont pu être observés par la stimulation de LTreg via l'administration de Calcitriol chez la souris, diminuant la progression des lésions (Dietrich et al., 2012).

L'athérosclérose est une maladie chronique inflammatoire de la paroi des vaisseaux dont les protéines des checkpoints immunitaires jouent un rôle important. En effet, celles-ci vont faciliter les interactions entre les cellules appartenant au système immunitaire (monocytes/macrophages, lymphocytes) et les cellules non immunitaires (CEs, plaquettes), dans le but de promouvoir ou d'inhiber l'activation des lymphocytes. Le mécanisme d'activation des lymphocytes T est schématisé dans la figure 52. Les protéines des "checkpoints"

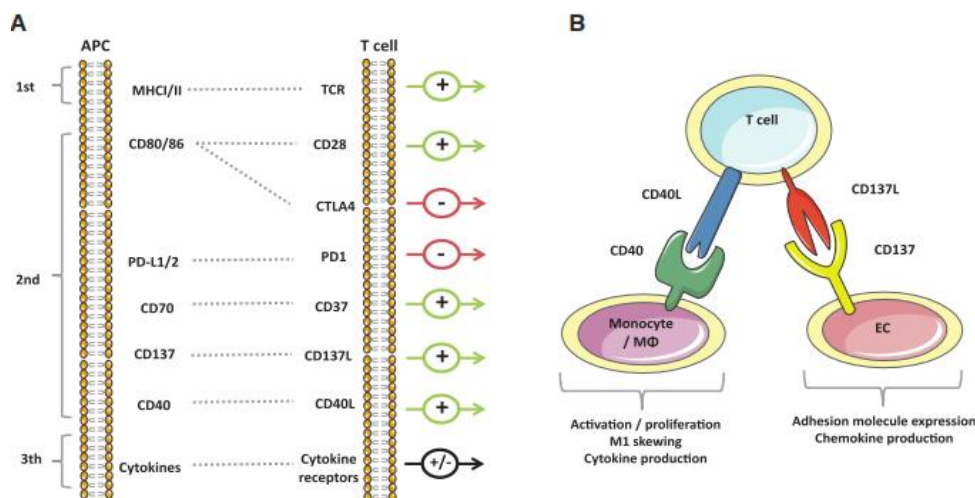


Figure 52 : Schéma résumant les interactions entre les CPA et les lymphocytes T. L'activation des lymphocytes T est un processus nécessitant 3 étapes : 1) la reconnaissance de l'antigène par les TCR via l'interaction entre MHCII/II et TCR. 2) l'interaction entre des molécules co-stimulatrices (CD80/CD86-CD28, CD70/CD37, CD137-CD137L et CD40/CD40L) vont permettre l'activation des LT. Certaines d'entre elles vont permettre de réguler cette activation (PD-L1/2-PD-1 et CD80/Cd86-CTLA-4). 3) Enfin, la libération de cytokines par les LT activés va promouvoir la propagation de la réponse immunitaire par voie auto et paracrine (A). Les protéines des "checkpoints" immunitaires facilitent les interactions entre les cellules de l'immunité innée et adaptative via l'interaction entre CD40L et son récepteur CD40 exprimé à la surface des monocytes/macrophages ou entre CD137L et son récepteur CD137 à la surface des CEs (B) (Kusters, Lutgens, et Seijkens, 2018).

de l'immunité sont des protéines transmembranaires exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et des LT, indispensables dans l'activation des LT. En oncologie, le potentiel thérapeutique de ces immunothérapies a été largement démontré durant ces dernières années.

Dans l'athérosclérose, l'évaluation de l'efficacité de drogues ciblant ces molécules en est encore au stade expérimental (Kusters, Lutgens, et Seijkens, 2018). En effet, des études réalisées chez l'homme ont montré une expression plus importante de CD80 et CD86 à la surface de CEs dérivées de monocytes au sein de lésions athéromateuses, suggérant une augmentation de l'effet co-stimulateur des LT, médié par les CPA chez des patients victimes d'un SCA (Dopheide et al.,

2007). CD40 et son ligand CD40L sont des protéines exprimées par de nombreuses cellules immunitaires (LB, LT, CD4, monocytes et macrophages), mais également non immunitaires telles que les CE, les plaquettes, les adipocytes et les CMLs, faisant de ces protéines, des cibles pertinentes dans le traitement de l'athérosclérose. Lutgens et al. ont observé, chez un modèle de souris double déficiente pour les protéines CD40 et ApoE, une réduction de l'athérosclérose, associée à la présence de macrophages de type M2, anti-inflammatoires (Lutgens et al., 2007). Ces données mettent en évidence l'intérêt de cibler ces molécules des "checkpoints" de l'immunité dans le traitement de l'athérosclérose (Kusters, Lutgens, et Seijkens, 2018).

III.B.3.4 Résolution de l'inflammation

Le défaut de résolution de l'inflammation est la principale cause de maladies chroniques inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, les maladies neurodégénératives et les maladies cardiovasculaires. La différence conceptuelle entre les thérapies dites anti-inflammatoires et celles dénommées pro-résolutives réside dans le fait que le blocage de l'inflammation, par l'inhibition d'enzymes ou de médiateurs, réduit la capacité du processus résolutif, indispensable au retour à l'homéostasie. Le déséquilibre entre les médiateurs pro-inflammatoires et les "specialized pro-resolving mediators" (SPMs) a été associé à l'apparition de maladie chronique telle que l'athérosclérose (Fredman et Tabas, 2017). La résolution de l'inflammation est régulée par des facteurs endogènes tels que les acides gras, les SPMs (résolvines, dérivés des acides gras polyinsaturés omega-3), et des protéines comme l'annexine A1. Chez des souris ApoE^{-/-}, le traitement avec des SPMs ou du collagène IV a eu pour effet d'augmenter l'épaisseur de la chape fibreuse ainsi que la synthèse de collagène au sein des lésions athéromateuses (Viola et al., 2016). Les dernières avancées scientifiques sur le sujet supportent la notion selon laquelle la stimulation, plutôt que le blocage de la réponse immunitaire de l'hôte, pourrait être la stratégie la plus efficace dans le traitement des maladies cardiovasculaires (Fredman et al., 2016). Néanmoins, ces études ont été réalisées dans des modèles animaux, il est donc difficile de transposer ces conclusions à l'homme, aux vues des différences importantes dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

irréversible des récepteurs P2Y₁₂ est une prodrogue qui nécessite d'être activée par une enzyme hépatique, le cytochrome P450, tout comme le Prasugrel, qui est métabolisé en un composé actif par le foie. Ce dernier possède des taux d'inactivation plaquettaire supérieurs au Clopidogrel, et l'essai clinique TRITON-TIMI 38 a permis de valider sa supériorité en comparaison du Clopidogrel dans la réduction des événements cardiovasculaires chez des patients présentant des antécédents de SCA, avec néanmoins une augmentation significative du risque hémorragique (Wiviott et al., 2007). Certains patients porteurs de mutations non-sens des enzymes nécessaires à l'activation de ces prodrogues ne répondent pas au traitement. Par conséquent, des inhibiteurs réversibles actifs du récepteur P2Y₁₂, analogues à l'ADP, ont été développés comme le Cangrelor ou le Ticagrelor. L'étude PLATO a confirmé la supériorité du Ticagrelor, en regard des événements cardiovasculaires, par rapport au Clopidogrel, malgré un risque hémorragique plus important (Mahaffey et al., 2011). De plus, un traitement prolongé (3 ans) au Ticagrelor chez des patients victimes d'un IMA a montré une réduction significative du risque de mortalité cardiovasculaire, d'IMA et d'AVC, en comparaison du placebo, malgré un risque de saignement plus important (Bonaca et al., 2015). Sa présence sous forme de médicament actif au sein de la circulation systémique confère au Ticagrelor des effets supplémentaires indépendants de son action sur le récepteur P2Y₁₂, exprimé par les plaquettes. Ces effets pléiotropes sont en partie médiés par l'inhibition de l'"erythrocyte nucleoside transporter" (ENT1), transporteur situé à la surface membranaire des globules rouges et des plaquettes (Figure 54). ENT1 est responsable de l'incorporation rapide et active de l'adénosine plasmatique. Son inhibition va entraîner une accumulation d'adénosine, associant les "effets adénosine" à ceux de l'inhibition plaquettaire par l'inhibition de P2Y₁₂. Ce mécanisme va donc renforcer son effet anti-plaquettaire par l'inhibition spécifique de récepteurs de type A₂, liés à l'adénylate cyclase. Les "effets adénosine" sont complexes puisqu'ils vont agir sur différents récepteurs (A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃). Ces récepteurs appartiennent tous à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et sont impliqués dans une grande variété de processus physiologiques et pathologiques. Par exemple, les récepteurs A_{2A}, A_{2B} et A₃ jouent un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire. En effet, les récepteurs A_{2A} sont très largement exprimés par les monocytes, les lymphocytes et les mastocytes. Il a été démontré que l'activation de ce récepteur entraînait une diminution de la

réponse inflammatoire, médiée en partie par l'inhibition de la migration des neutrophiles et la diminution de cytokines pro-inflammatoires (Barletta, Ley, et Mehrad, 2012). Chez l'homme, des taux plus importants d'adénosine plasmatique ont été mesurés chez les patients traités au Ticagrelor, en comparaison de patients sous Clopidogrel (Gerczuk et Kloner, 2012 ; Bonello et al., 2014). Dans une étude prospective récente comparant l'effet du Ticagrelor et du Prasugrel sur la fonction endothéliale et l'inflammation, Jeong Hu et al. ont observé une amélioration significative de la fonction endothéliale, par la mesure de la baFMD (brachial artery flow mediated dilatation) et une réduction du taux de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6, chez des patients diabétiques avec un SCA (NSTEMI) nécessitant la pose d'un "stent", traités 10 semaines au Ticagrelor en comparaison au groupe sous Prasugrel. Ces résultats suggèrent un effet anti-inflammatoire indépendant de l'inhibition de P2Y₁₂ (Jeong et al., 2017). Chez la souris, il a également été rapporté des propriétés anti-thrombotiques du Ticagrelor médiées par la réduction de l'expression du FT par les CE, qui pourraient expliquer en partie son efficacité plus importante dans la réduction des évènements thrombotiques dans certaines études cliniques (Reiner et al., 2017).

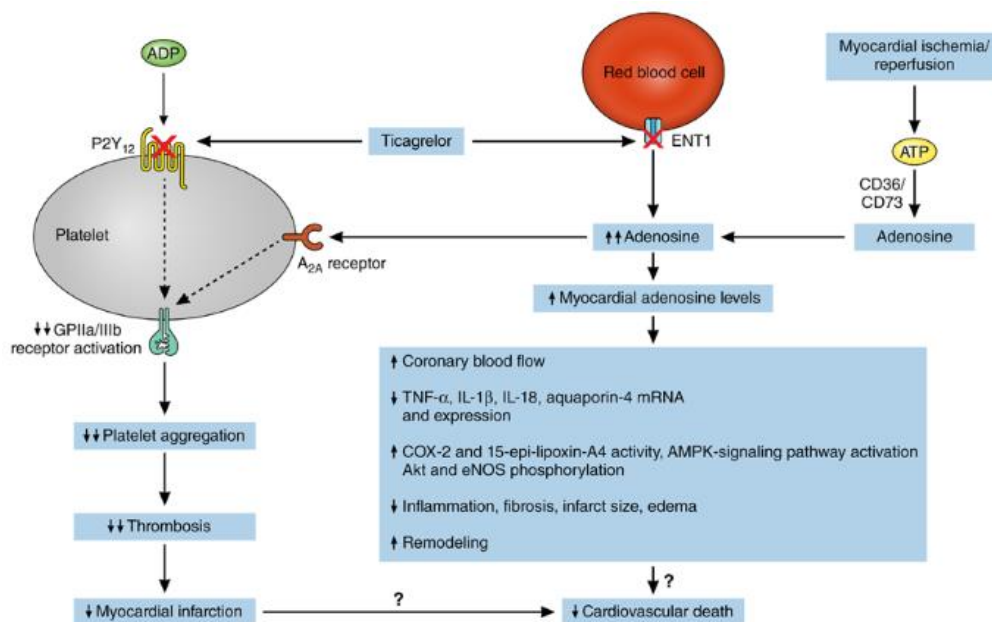


Figure 54 : Effets pléiotropes du ticagrelor. Le récepteur à l'ADP P2Y₁₂, est un amplificateur de l'activation plaquettaire médiée par la stimulation de celui-ci par de multiples agonistes. Le ticagrelor inhibe un transporteur majeur de l'adénosine "equilibrative nucleoside transporter-1" (ENT1), augmentant le taux endogène d'adénosine. L'adénosine atténue les lésions engendrées par l'ischémie/reperfusion au travers de mécanismes qui vont influencer le taux d'évènement cardiovasculaire. ADP= adenosine diphosphate, AMPK= adénosine monophosphate-activated kinase, COX=cyclooxygénase, eNOS=endothelial nitric oxide synthase, G=glycoprotéine, IL= interleukine, mRNA= acide ribonucléique messenger, TNF- α =Tumor necrosis factor alpha (Gurbel, Jeong, et Tantry, 2016).

Néanmoins, des études cliniques rapportent des résultats en contradiction avec les précédentes observations, notamment dans l'étude PRAGUE-18, où aucune supériorité de l'efficacité du traitement au Ticagrelor en comparaison au Prasugrel n'a été observée, chez des patients ayant eu un IMA et traités par intervention percutanée (Motovska et al., 2016). L'absence d'effets anti-inflammatoires et anti-athérogènes de ces inhibiteurs a également été rapportée par certaines équipes de recherche sur des modèles murins d'athérosclérose.

III.B.4.2 Anti-coagulants

Malgré l'efficacité des traitements anti-plaquettaires, 10% des patients traités souffriront d'un évènement récurrent et présenteront un risque de saignement important. De manière concomitante au processus d'agrégation plaquettaire, la cascade de la coagulation est également activée : le facteur tissulaire est sécrété et catalyse la conversion du facteur X en Xa, entraînant la formation de thrombine. Ces effets peuvent perdurer durant plusieurs mois (Merlini et al., 1994) et ils illustrent le rôle important joué par l'activation de la cascade de la coagulation en combinaison de l'activation plaquettaire dans le SCA, démontrant l'intérêt de cibler ce mécanisme en supplément des plaquettes dans la prévention du risque de récurrence. L'anti-coagulant le plus efficace à l'heure actuelle est le Rivaroxaban. Celui-ci possède une action inhibitrice directe sur le facteur de coagulation Xa. En association à une bithérapie anti-plaquettaire, celui-ci a montré une réduction significative d'évènements ischémiques dans l'étude ATLAS ACS 2-TIMI 51 (Mega et al., 2012). Dans la lignée de cette précédente étude, l'étude COMPASS a visé à évaluer la balance bénéfique/risque du Rivaroxaban, en prévention secondaire chez des patients présentant une maladie coronaire, en association ou non avec l'aspirine. Les 27 000 participants de cette étude ont été répartis en 3 groupes (Rivaroxaban faible dose + aspirine, Rivaroxaban forte dose + placebo, aspirine seule + placebo). Les résultats de l'étude ont montré que le Rivaroxaban à faible dose associé à l'aspirine a permis de réduire significativement les évènements ischémiques ainsi que la mortalité (Eikelboom et al., 2017). En revanche, une augmentation des complications hémorragiques majeures a été observée. Ces résultats suggèrent l'intérêt d'un tel traitement en prévention secondaire chez des patients à haut risque de récurrence.

De plus, chez un modèle de souris ApoE^{-/-}, un effet anti-athérogène du Rivaroxaban a été observé, médié par l'inhibition des récepteurs au facteur de coagulation Xa, que sont les PAR-1 et 2. L'administration du Rivaroxaban (5 mg/kg/j) durant 20 semaines a réduit significativement la surface des lésions athéromateuses en comparaison des animaux du groupe contrôle, et a également diminué l'expression de molécules pro-inflammatoires telles que les MMP-9 et le TNF- α , suggérant un effet additionnel anti-athérogène de cet agent thérapeutique (Hara et al., 2015).

Ces nouvelles avancées permettent d'envisager de nouveaux parcours de soin plus personnalisés pour le patient, basés sur le dosage de biomarqueurs (LDL-C, hsCRP...), et par l'utilisation de différentes modalités d'imagerie. Par exemple, des patients avec un taux de LDL-C supérieur à la norme malgré un traitement aux statines pourraient recevoir un traitement additif à base d'Ezétimibe (IMPROVE-IT) ou d'inhibiteur des PCSK-9 (FOURIER). Les patients présentant un taux de hsCRP élevé se verraient prescrire un inhibiteur de l'IL-1 β (CANTOS), dans le but de réduire le risque résiduel. L'imagerie fonctionnelle du processus inflammatoire pourrait être un outil idéal dans l'évaluation de ces nouveaux agents thérapeutiques, ou dans la sélection des patients pouvant en bénéficier.

Depuis ces 20 dernières années, les statines constituent la classe thérapeutique la plus efficace dans le traitement des hyperlipidémies et de l'athérosclérose, en prévention primaire ou secondaire. De récentes méta-analyses ont confirmé la nette réduction du taux de LDL-C associée à une réduction significative du risque d'évènement cardiovasculaire chez les patients traités par ces médicaments. Néanmoins, de nouvelles thérapies hypolipémiantes ont été développées afin de pallier le manque d'efficacité des statines chez certains patients intolérants. L'ézétimibe et plus récemment les anti-PCSK9 font partie des thérapies les plus prometteuses. Malgré la réduction importante du taux de LDL-C obtenue par ces différentes thérapies, le risque résiduel reste important, notamment chez les patients ayant été victime d'un IM. Récemment, l'étude CANTOS a permis de valider l'intérêt de cibler le processus inflammatoire dans le traitement de la maladie coronaire liée à l'athérosclérose. Ces résultats positifs ont confirmé pour la première fois le lien entre l'inflammation et l'athérosclérose, et ont ouvert la voie au développement de nouvelles thérapies anti-inflammatoires, plus ciblées. D'autres classes médicamenteuses ont fait l'objet d'une attention particulière durant cette dernière décennie. Les antiplaquettaires et les anticoagulants, indispensables en prévention secondaire dans la réduction du risque de récurrence d'évènements cardiovasculaires chez des patients victimes d'un IM et chez qui une angioplastie est programmée, ont été suggérés dans de récentes études précliniques et cliniques comme possédant des effets pléiotropes anti-athérogènes pouvant être bénéfique à long terme.

IV IMAGERIE DE LA PLAQUE VULNERABLE

Chaque année, plus de 8 millions de personnes meurent d'un SCA. Malgré l'amélioration de la prise en charge des patients, l'infarctus du myocarde reste un évènement imprévisible. De nombreuses études *post-mortem* ont montré que la rupture de la plaque vulnérable était responsable de la majorité de ces décès. Ces plaques sont caractérisées par une fine chape fibreuse (<65 μm), un large corps nécrotique et lipidique, et infiltrées par de nombreux macrophages. Le score de risque cardiovasculaire, basé sur des facteurs de risque tels que le tabagisme, l'hypercholestérolémie, l'hypertension, l'âge, le sexe et les antécédents familiaux, reste imprécis concernant l'estimation du risque d'évènement cardiovasculaire chez les patients à risque intermédiaire (Falk et al., 2011). Compte tenu de l'incertitude de ces modèles prédictifs actuels à l'échelle de l'individu, la recherche de nouvelles stratégies permettant de discriminer les patients qui pourraient bénéficier d'un traitement préventif intensif reste primordiale.

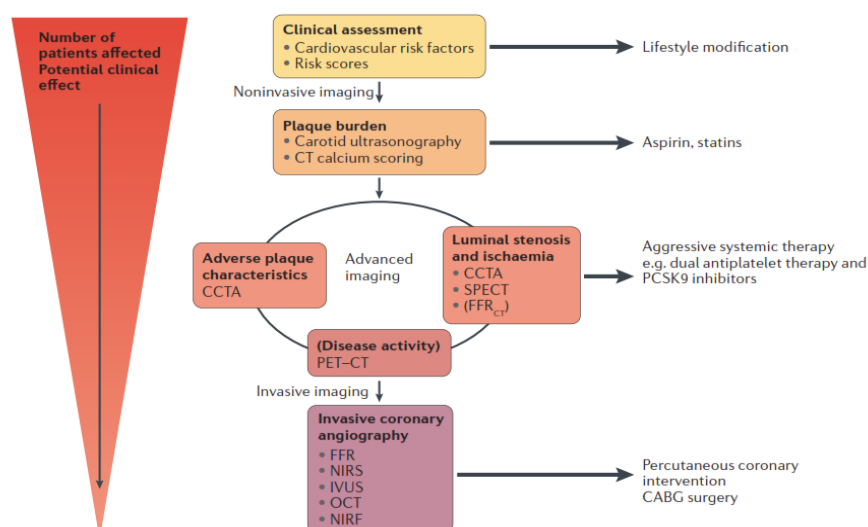


Figure 55 : Parcours potentiel à l'aide de l'imagerie multimodale dans la stratification du risque chez des patients présentant de l'athérosclérose. Une première sélection par l'évaluation des facteurs de risque et l'utilisation de stratégies simples d'évaluation de la charge d'athérome peut être effectuée au sein d'une large population afin d'initier les premiers traitements (aspirine, statine). Pour les patients présentant une charge d'athérome plus élevée, des modalités d'imagerie plus avancées peuvent être employées dans le but d'évaluer le degré de sténose, l'ischémie du myocarde (CCTA, SPECT, FFR_{CT}) et les caractéristiques de la plaque (CCTA), afin d'identifier les patients les plus à risque d'un futur évènement cardiovasculaire. Les patients vulnérables recevront des traitements systémiques agressifs à base d'anti-PCSK-9 et/ou d'anti-IL-1 β . Enfin, pour les patients chez qui une procédure de revascularisation est planifiée, les modalités d'imagerie invasive pourront être utilisées afin d'optimiser la décision (Dweck, 2016). CCTA=coronarographie par tomographie à densité de matière, SPECT= single photon emission computed tomography, FFR_{CT}= CCTA-derived fractional flow reserve.

L'imagerie cardiovasculaire permettrait d'identifier et de reclassifier ces patients asymptomatiques considérés à risque intermédiaire afin d'améliorer leur prise en

charge, notamment par le suivi des recommandations de prévention primaire des patients à haut risque (Perk et al., 2012) (Figure 55). De nombreuses modalités d'imagerie ont été développées afin de détecter ces plaques. Elles visent soit à identifier des critères morphologiques de la plaque vulnérable, soit à cibler des molécules impliquées dans les processus moléculaires qui la caractérisent, par l'utilisation de modalité d'imagerie invasive et non invasive. Ces outils permettraient également d'évaluer l'efficacité thérapeutique d'un médicament.

IV.A Imagerie intravasculaire coronarienne

IV.A.1 Coronarographie (ICA)

La première modalité d'imagerie vise à évaluer le degré de sténose coronarienne engendrée par la plaque d'athérome. Développée à partir de la fin des années 1940, cette technique repose sur la mesure de l'atténuation du faisceau de rayons X, qui dépend à la fois de la densité et de l'épaisseur des structures traversées. L'angiographie coronarienne invasive est devenue la méthode de référence dans le diagnostic de la maladie coronarienne. Elle consiste à injecter un produit de contraste opaque aux rayons X par un cathéter. Puis, en fonction de l'angle d'incidence, différents clichés sont réalisés permettant de rendre compte du niveau d'occlusion des artères coronariennes. Cette technique permet d'estimer le risque cardiovasculaire et d'évaluer la nécessité de réaliser une angioplastie. Elle possède une résolution spatiale et temporelle excellente (200 μm , 5 ms respectivement). Néanmoins, l'évaluation du degré d'occlusion des artères coronariennes détecté par coronarographie corrèle faiblement avec les valeurs hémodynamiques, plus particulièrement pour les sténoses coronaires comprises entre 30 et 80% (Tonino et al., 2009). Ces lacunes ont laissé la place à d'autres techniques invasives permettant une mesure des paramètres hémodynamiques plus précise, en particulier par le biais de la mesure de la fraction du flux coronarien de réserve (FFR). Il s'agit d'un indice permettant de rendre compte de la sévérité d'une sténose au niveau du réseau coronaire épigardique, et il se définit par le rapport entre le flux sanguin myocardique maximal au sein de la sténose et le flux sanguin maximal théorique (Pijls et al., 1993). En pratique, il s'exprime comme le rapport entre la pression intracoronaire moyenne distale (P_d) et la pression proximale (P_a) à la lésion ($\text{FFR} = P_d/P_a$). Une FFR inférieure ou égale à 0,75 est considérée comme

significative (présence d'ischémie). Le bénéfice à un an, pour des patients chez qui l'on suspecte un angor stable ou un SCA, se traduit par une diminution de la survenue d'évènements cardiovasculaires graves lorsque la décision de réaliser une angioplastie a été fondée sur des mesures de FFR, par rapport aux patients chez qui cette mesure n'a pas été effectuée (angiographie sans FFR). En résumé, une sténose n'ayant pas d'effet hémodynamique important ($FFR > 0,75$) ne nécessite pas d'intervention chirurgicale (revascularisation) et peut être traitée par un traitement médicamenteux (Pijls et al., 2007 ; Tonino et al., 2010).

Bien évidemment, la coronarographie présente des limites, en particulier dans la détection des plaques vulnérables de type TCFA qui ont un remodelage positif (Glagov et al., 1987) et ne vont pas être détectées par cette technique (Little et al., 1988). De nouvelles modalités d'imagerie intravasculaire ont émergé. Celles-ci visent à identifier directement les plaques d'athérome à haut risque, susceptibles de causer un futur évènement cardiovasculaire. Parmi ces techniques, on retrouve l'"intravascular ultrasound" ou l'échographie endovasculaire (IVUS), l'"optical coherence tomography" ou la tomographie par cohérence optique (OCT), la "near infrared-fluorescence" ou la fluorescence dans le proche infrarouge (NIRF) et la "near infrared spectroscopy" ou la spectroscopie dans le proche infrarouge (NIRS) ; toutes fournissant des informations détaillées sur la composition des plaques coronariennes chez des patients sous angioplastie.

IV.A.2 *IVUS*

L'IVUS est la modalité d'imagerie intra-coronarienne la plus utilisée actuellement pour l'identification des plaques vulnérables. Elle fournit des mesures anatomiques au-delà des modalités d'imagerie conventionnelle (angiographie). Dans le but de détecter les plaques instables, l'IVUS permet d'identifier certaines caractéristiques spécifiques de ces lésions telles que le remodelage positif, le cœur lipidique, et la charge d'athérosclérose. Le cathéter de l'IVUS génère des ondes dont la fréquence varie entre 20 et 60 MHz via un transducteur piézoélectrique. L'échelle de gris obtenue par IVUS est limitée dans ces capacités à différencier les composants de la plaque, et a été remplacée par une analyse spectrale de la radiofréquence rétrodiffusée, appelée également histologie virtuelle (VH-IVUS). Plus spécifiquement, l'échographie endovasculaire par

radiofréquence (VH-IVUS) permet la détection des plaques de type TCFA présentes au niveau des artères coronaires. Cette technique a été utilisée dans une étude prospective multi-centrique (PROSPECT), sur une cohorte de 697 patients (Stone et al., 2011). Dans cette étude, l'identification des lésions par VH-IVUS a été prédictive de l'incidence d'évènements coronariens. En effet, il a été montré que des patients diabétiques présentant des lésions non coupables avec les caractéristiques suivantes : une charge d'athérome >70%, une surface minimale luminale à 4 mm² et une chape fibreuse fine, avaient un risque de MACE de 18,2% en cas de présence de ces 3 paramètres, 10,5% pour deux et 4,8% pour un seul de ces critères (Figure 56). Ces résultats ont été confirmés dans l'étude ATHEROREMO-IVUS (Cheng et al., 2014). La valeur prédictive négative de récurrence de lésions non coupables est excellente (>99%) lorsque ces lésions ne présentent pas l'un des 3 critères de vulnérabilité de la plaque (chape fibreuse mince, charge d'athérome ou sténose luminale significative). La charge d'athérome, appelée "plaque burden", est définie comme la différence entre le volume total du vaisseau et celui de la lumière, et est exprimée en pourcentage du volume total du vaisseau. Ce paramètre permet de caractériser les plaques à haut risque, lorsque celui-ci est supérieur à 70%. En revanche, la valeur prédictive positive de cet outil dans la détection des plaques à haut risque est assez faible (18,2%). Sur les 595 plaques de type TCFA, seules 9 ont été responsables d'un IMA. Des résultats similaires ont été rapportés dans l'étude VIVA (Calvert et al., 2011), suggérant une faible valeur prédictive positive de cette modalité d'imagerie.

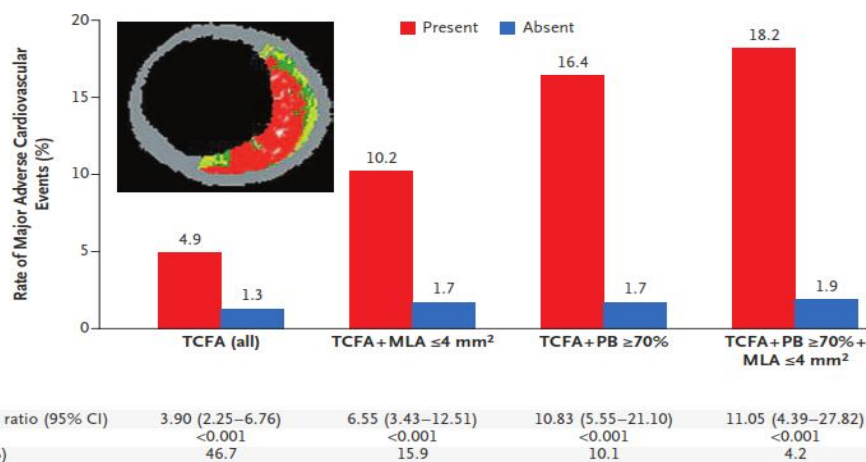


Figure 56 : Taux d'évènements cardiovasculaires majeurs (MACE) sur un suivi de 3,4 ans à la suite d'un SCA associé aux plaques non responsables du SCA initial. Ces plaques ont été classées par VH-IVUS en plaques à mince capsule fibreuse (TCFA), en plaques à capsule fibreuse épaisse (ThCFA) et en plaques non athéromateuses. La prévalence des TCFA, ThCFA et des plaques non athéromateuses a été de 47%, 68% et 68% respectivement (Stone et al., 2011).

IV.A.3 Tomographie par cohérence optique (OCT)

L'OCT utilise la lumière émise dans le proche infrarouge au travers d'une fibre optique rotative permettant d'obtenir une haute résolution spatiale (10-20 μm). Cette modalité d'imagerie fournit des mesures précises de l'épaisseur de la chape fibreuse, corrélant fortement avec les mesures histologiques (Kume et al., 2006), et présentant une bonne sensibilité et spécificité dans la différenciation des plaques (Partida et al., 2018). Jia et al. ont établi les critères diagnostiques par OCT des érosions de plaque, qui reposent sur la présence d'une chape fibreuse intacte et une surface intimale irrégulière suggérant la présence d'un thrombus (Jia et al., 2013). De plus, dans cette même étude, l'identification des plaques présentant des nodules calciques par OCT a été caractérisée par la visualisation d'une chape fibreuse discontinue, composée de calcifications saillantes et superficielles. Enfin la rupture de plaque a été définie par la présence d'une chape fibreuse discontinue, avec formation d'une cavité vide au sein des lésions (Figure 57). Suivant ces différents critères diagnostiques et en accord avec les études anatomopathologiques, l'incidence des érosions de plaque déterminée par OCT a été supérieure chez les patients NSTEMI en comparaison des STEMI (Partida et al., 2018). L'identification des différentes lésions responsables d'un SCA offre l'opportunité d'évaluer l'efficacité des différentes stratégies thérapeutiques utilisées en pratique clinique chez des patients victimes d'un SCA.

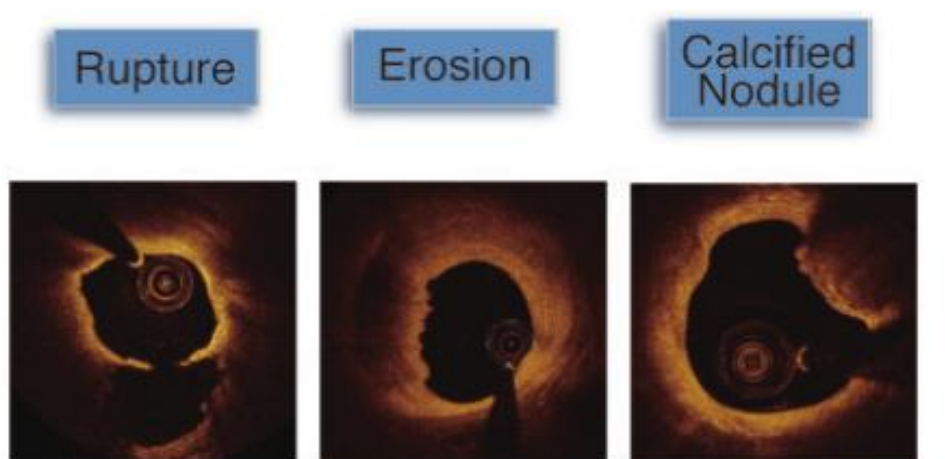


Figure 57 : Imagerie par OCT d'une rupture de plaque avec présence d'une couche lipidique superficielle et de la rupture de la chape fibreuse à 6h, communiquant avec une cavité vide (gauche). L'érosion de plaque détectée par OCT présente des structures vasculaires conservées avec présence d'un thrombus riche en plaquettes (milieu). Sur l'image de droite, des nodules calciques sont identifiés à 1-3h (Partida et al., 2018).

L'étude EROSION, publiée en 2016 par Jia H et al., a montré pour la première fois l'intérêt d'une thérapie anti-thrombotique sans implantation de "stent" dans

le but de stabiliser des patients dont les plaques de type érosion ont été responsables d'un SCA (Jia et al., 2016). Ces résultats ont été confirmés 1 an plus tard par Hu et al., démontrant l'efficacité de cette stratégie pour la même population de patients (érosion de plaque responsable d'un SCA), en comparaison des patients dont l'étiologie du SCA était une rupture de plaque (Hu et al., 2017). Ces études suggèrent que l'intervention pharmacologique (anti-agrégant/anti-coagulant) serait plus efficace que l'intervention mécanique dans la prise en charge des patients dont l'érosion de plaque est responsable d'un SCA.

Néanmoins, cette technique d'imagerie possède quelques désavantages notables, tels qu'un temps d'acquisition assez long, l'impossibilité d'évaluer la structure profonde des plaques, tout comme la faible discrimination entre les zones calcifiées et lipidiques.

OFDI (Optical frequency domain imaging)-TCFA

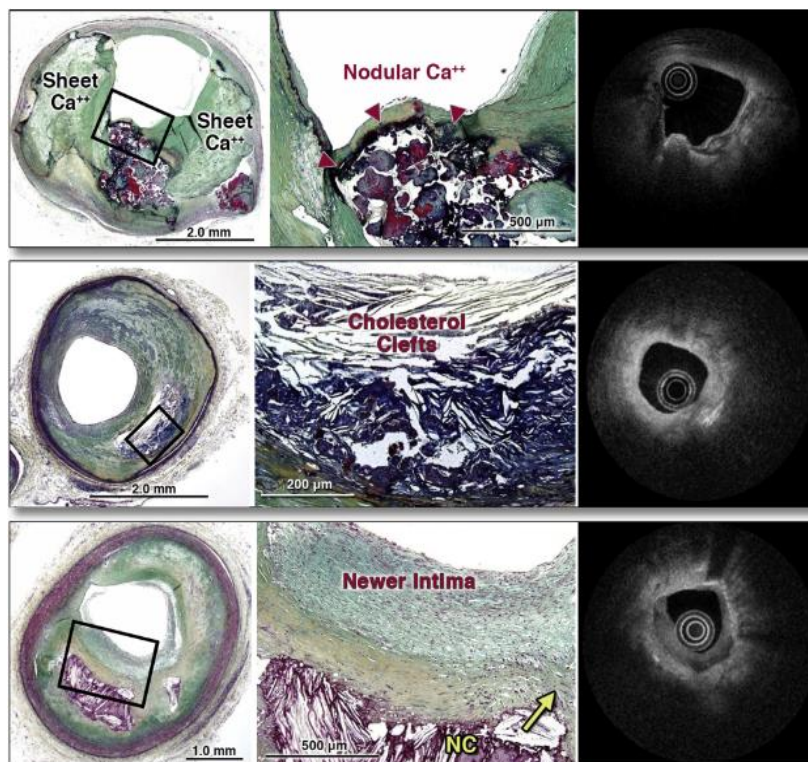


Figure 58 : Rangée supérieure : Mise en évidence par coloration histologique de la présence de feuillets (gauche) et de nodules calciques (milieu). Dans l'image correspondante par OFDI (droite), les calcifications apparaissent brillantes en surface avec une traînée ombragée. La présence de cristaux de cholestérol (rangée du milieu) est également visible par surbrillance sur l'image OFDI, confirmée par colorations histologiques (gauche et milieu). Rangée inférieure : La guérison d'une rupture de plaque est visible (flèche jaune) sur les colorations histologiques (à gauche et au milieu). Le thrombus non occlusif a été remplacé par une nouvelle couche de CEs, qui apparaît en vert sur la coloration Movat. Sur l'image OFDI (à droite), celle-ci est visible, plus sombre que la couche sous-jacente riche en collagène (Nakano et al., 2016).

Cette technique, que l'on peut présenter comme la seconde génération d'OCT, par l'exploitation d'une transformation de Fourier rapide, offre l'avantage d'une meilleure vitesse de retrait de la fibre endocoronaire, une meilleure résolution et ne nécessite plus la présence d'un ballon d'occlusion. L'analyse *ex-vivo* par OFDI d'artères coronariennes a montré une grande

habileté dans la reconnaissance de microstructures caractéristiques des plaques athéromateuses (Figure 58). Les résultats d'une étude prospective récente n'ont pas montré d'infériorité de l'OFDI en comparaison de l'IVUS en termes de résultats cliniques, et le bénéfice apporté par ces 2 modalités d'imagerie a permis d'optimiser la procédure de positionnement et d'expansion du "stent" pour 1/3 des participants (Kubo et al., 2017).

IV.A.4 NIRF

Cette modalité d'imagerie intravasculaire a été développée afin d'obtenir une image haute résolution des artères coronariennes. Son principe est basé sur l'injection de sondes fluorescentes dans le proche infra-rouge. Son principal avantage réside dans les propriétés de la lumière émise dans le proche infrarouge (entre 700 et 900 nm) qui permet de s'affranchir de l'auto-

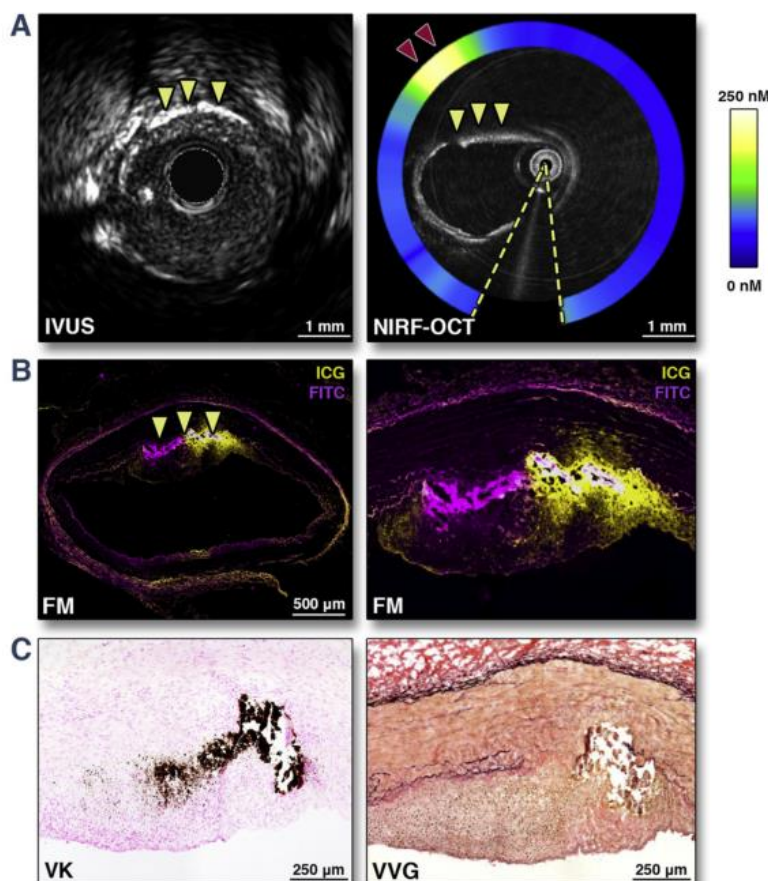


Figure 59 : Coregistration d'images IVUS et NIRF au niveau de la branche descendante de l'artère coronaire gauche de cochons, avec un signal NIRF intense (flèches rouges) à 10 heures après injection d'ICG (A). Captation hétérogène d'ICG au sein d'une plaque présentant une calcification de l'intima et de la média (flèches jaunes) (B). Faible et fort grossissement de colorations au Von Kossa (VK), mettant en évidence la présence de calcifications (marron), et Verhoeff-Von Gieson (VVG) (fibres élastiques) au sein de lésions captant fortement l'ICG (C) (Verjans, 2016).

fluorescence des tissus environnants et d'une pénétration tissulaire importante. Elle permet de réaliser l'acquisition d'images au travers du sang sans "flushing" préalable. Jaffer FA et al. ont développé et testé avec succès le premier cathéter flexible permettant de réaliser l'imagerie *in vivo* intravasculaire par NIRF, en évaluant l'activité de protéases reflétant l'inflammation au sein des lésions athéromateuses des artères iliaques chez le lapin (Jaffer et al., 2008).

Dans le but de transférer cette technologie chez l'homme, un fluorochrome approuvé par la FDA, l'"indocyanin green" (ICG), possédant des propriétés intéressantes pour l'imagerie de l'athérosclérose, notamment par ses capacités lipophiles (il se lie aux LDL et aux HDL) et s'accumulant dans des zones inflammatoires, a été évalué. En combinaison à l'OCT, l'ICG détectée par NIRF a permis la localisation de lésions athéromateuses coronariennes riches en lipides, chez un modèle de cochon diabétique sous régime hypercholestérolémiant (Verjans et al., 2016). Dans cette étude, l'ICG semblait être localisé dans des régions présentant un endothélium compromis avec infiltration de nombreux macrophages et une hémorragie intra-plaque, caractéristiques des plaques vulnérables (Figure 59).

IV.A.5 NIRS ("*near-infrared spectroscopy*")

La spectroscopie est la mesure du spectre électromagnétique au travers des interactions des molécules avec la lumière. Basée sur cette méthode, l'imagerie par NIRS des artères coronaires permet la caractérisation chimique des tissus biologiques et peut être utilisée dans l'évaluation de la composition en lipides et en protéines des lésions athéromateuses (Wang et al., 2002). A l'aide d'un cathéter, une fibre optique rotative émettant et recevant dans l'infrarouge permet d'évaluer la proportion de lumière réfléchi sur la plage de longueur d'onde d'optique. Contrairement à l'IVUS et à l'OCT, la NIRS ne fournit pas d'images tomographiques mais un "chimiogramme" sous forme d'une signature spectroscopique allant de l'intima à l'adventice (Figure 60). L'avantage de cette technique réside dans sa profondeur de pénétration, en comparaison à des spectres d'émission dans la lumière visible, qui permet l'évaluation du contenu lipidique des lésions athéromateuses, plus spécifiquement des plaques présentant un remodelage positif. Combinée à l'IVUS, il a été démontré dans une récente étude *post-mortem* qu'il était possible d'identifier par NIRS les lésions de type TCFA, définies par les critères de sélection suivants : une charge d'athérome >69%, un index de remodelage >1,07, déterminée par échelle de gris en IVUS, et un LCBL (lipid core burden index)>323, mesuré par NIRS (Inaba et al., 2017). L'étude "lipid-rich plaque" (LRP) évaluera sur plus de 1500 participants l'intérêt de cette modalité d'imagerie dans la détection des plaques

riches en lipides pour l'identification des plaques vulnérables (Waksman et al., 2017).

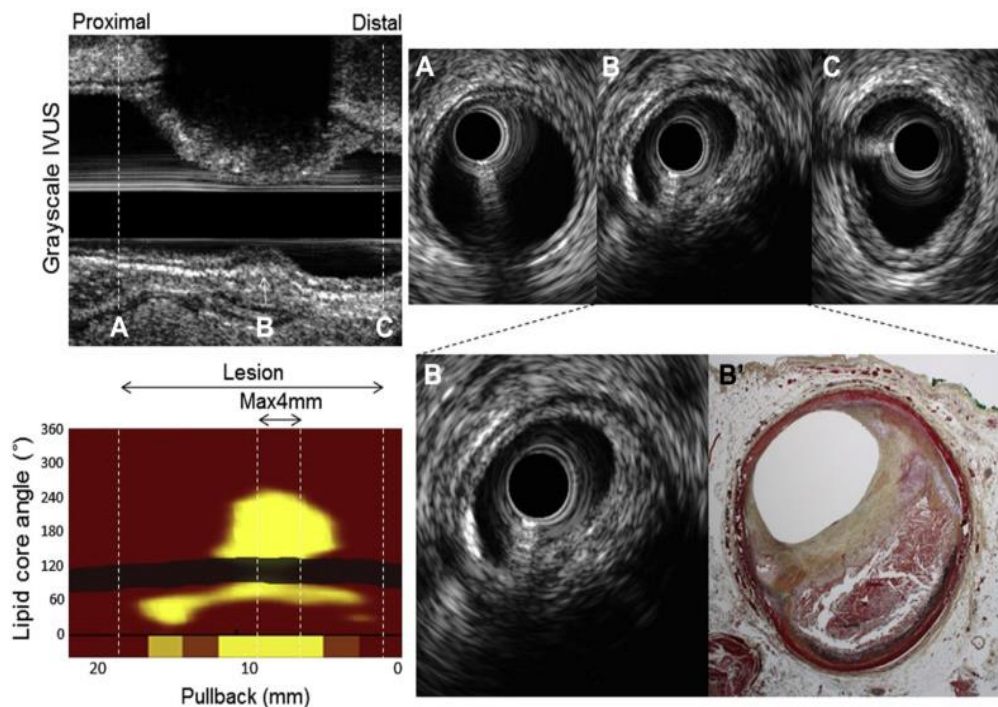


Figure 60 : Exemple d'images IVUS (rangée supérieure) et NIRS (inférieure gauche). En haut à gauche est présentée une image IVUS en vue longitudinale (gauche) et transversale (droite) à différents niveaux ; avant (A), au niveau (B) et après la plaque (C). En bas à gauche est présenté le "chemiogramme" obtenu en NIRS le long du même segment visualisé par IVUS. Agrandissement de la section (B) avec coloration trichrome correspondante, mettant en évidence une lésion athéromateuse riche en lipides (Inaba et al., 2017).

IV.B Imagerie non invasive

En comparaison de l'imagerie invasive, les modalités d'imagerie non invasives semblent plus appropriées dans l'objectif de reclassifier des individus à risque cardiovasculaire intermédiaire.

Deux stratégies différentes ont été développées afin d'identifier des plaques vulnérables. L'une consiste à détecter des critères morphologiques, comme la charge d'athérome (imagerie morphologique), et la deuxième vise à évaluer des critères fonctionnels ou moléculaires, caractéristiques des plaques vulnérables (imagerie fonctionnelle, moléculaire).

IV.B.1 Morphologique

Les 3 principales modalités d'imagerie morphologique non invasives sont les suivantes : la CCTA, l'échographie et l'IRM.

IV.B.1.1 Coronarographie par tomodensitométrie (CCTA)

A la différence de l'angiographie, le scanner coronaire permet d'obtenir une image tridimensionnelle du cœur après reconstruction des images obtenues sous différents angles. Cette modalité d'imagerie permet de visualiser de manière non invasive les artères coronaires après injection d'un produit de contraste. Deux types de scanner sont actuellement utilisés, l'un basé sur une source de rayons X fixe (EBCT, electron beam computed tomography), le second sur une émission hélicoïdale dont les rayons X vont être enregistrés à l'aide de plusieurs rangées de détecteurs (MSCT, Multi Slice Computed Tomography), jusqu'à 320 actuellement. Avec ces derniers scanners multibarettes, il est possible de couvrir la totalité du cœur sur un seul champ de vue, permettant de réduire l'exposition des patients aux rayonnements ionisants des rayons X tout en conservant son efficacité diagnostique (Dewey et al., 2009). Le scanner nécessite d'être synchronisé à l'ECG. Une fréquence cardiaque <65 bpm améliore fortement la qualité des images, et peut impliquer l'injection de β -bloquants en cas de tachycardie. Sa haute résolution spatiale (0,6 mm), son faible temps d'acquisition (une apnée d'une dizaine de secondes) et sa valeur prédictive négative élevée (<98%) en font une technique performante dans l'évaluation des sténoses obstructives. En effet, plusieurs essais cliniques ont montré l'efficacité de cette technique d'imagerie dans la détection des sténoses coronaires comprises entre 50 et 70% chez des patients avec (Meijboom et al., 2008) ou sans maladie coronaire connue (Budoff et al., 2008). Dans certains cas, la sévérité de l'occlusion peut être surestimée, notamment lorsque les artères coronaires présentent une calcification importante. De plus, l'examen reste assez irradiant puisque la dosimétrie associée est comprise entre 8 et 24 mSv. Les recommandations de l'ESC concernant l'utilisation du scanner coronaire suggèrent son utilisation chez les patients ayant un risque cardiovasculaire intermédiaire, notamment chez le patient stable (angor stable). Cette modalité est classée IIb selon l'ESC. En effet, l'étude PROMISE n'a pas montré de bénéfice dans la stratification des patients à haut risque par CTCA par rapport aux examens standards (tests fonctionnels d'exploration des coronaires). En revanche, dans cette même étude, une meilleure sélection des patients nécessitant une angioplastie due à la présence d'une sténose coronaire a été observée chez les patients ayant eu une CCTA par rapport aux modalités

d'imagerie standard (Douglas et al., 2015). Dans l'étude SCOT-HEART, Newby et al. ont montré l'intérêt de cette modalité d'imagerie dans le diagnostic de la maladie coronaire chez le patient stable (CT Coronary Angiography in Patients with Suspected Angina Due to Coronary Heart Disease (SCOT-HEART): An Open-Label, Parallel-Group, Multicentre Trial, 2015). En revanche, le scanner n'est pas recommandé chez les patients à faible risque, asymptomatiques. La coronarographie reste toujours la modalité d'imagerie recommandée chez les patients à haut risque.

La coro-TDM est également utilisée afin de déterminer le score calcique (CACs), et peut ne pas nécessiter l'injection d'un produit de contraste. La présence de calcium au sein des artères coronaires est un marqueur de la maladie coronaire. Cette méthode est basée sur la mesure de la densité et de la surface des calcifications, détectées soit par MSCT, soit par EBCT (Nasir et al., 2003). Ces calcifications sont mesurées lorsque leur surface d'hyper-atténuation est $>1 \text{ mm}^2$ avec une intensité $>130 \text{ HU}$ ou > 3 pixels adjacents (Agatston et al., 1990). Ce score est obtenu en multipliant la surface des calcifications par la densité de la plaque (par un facteur 0 pour une densité inférieure à 130, un facteur 1 entre 130 et 199, un facteur 2 entre 200 et 299, un facteur 3 entre 300 et 399 et un facteur 4 pour une densité supérieure à 400).

Il existe différentes méthodes permettant de déterminer ce score :

- Score basé sur la méthode d'Agatston (Detrano et al., 2008).
- Score basé sur le volume de calcification (Hong et al., 2002).
- Score de masse calcique (Yoon et al., 1997).

Le score d'Agatston, est actuellement l'un des outils les plus intéressants dans l'estimation du risque d'évènement cardiovasculaire (Detrano et al., 2008). Dans l'étude MESA, la prévalence des calcifications varie avec l'âge et le sexe, de 14% chez un jeune sujet, et pouvant aller jusqu'à 70% chez un sujet âgé. Le risque relatif de maladie cardiovasculaire augmente, de 0-400, de 400-1000 et > 1000 , après ajustement des autres facteurs de risque cardiovasculaires. L'évaluation de ce score est considérée comme un outil intéressant dans l'évaluation du risque cardiovasculaire chez des patients asymptomatiques à risque intermédiaire (Polonsky et al., 2010).

De nouvelles applications ont été développées à partir du CCTA, notamment dans l'étude de la perfusion myocardique, l'estimation de la réserve du flux coronarien (FFR_{ct}) et la caractérisation de la plaque d'athérome (Figure 61).

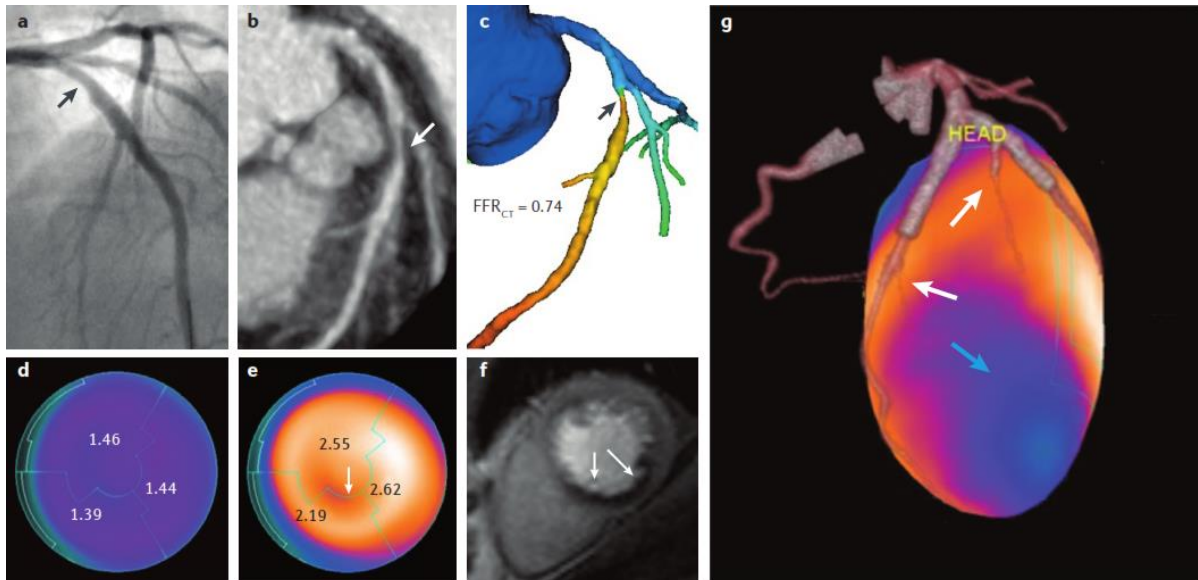


Figure 61 : Evaluation par CCTA de la sténose coronarienne, des obstructions hémodynamiques et de l'ischémie myocardique chez différents patients. Angiographie invasive permettant l'identification d'une sténose dans la partie proximale de l'artère coronaire descendante antérieure gauche (flèche). CCTA réalisée chez le même patient illustrant la présence d'une sténose >50% dans le même segment d'artère coronarienne (B) (flèche). FFR_{ct} du même patient démontrant que cette lésion a un retentissement fonctionnel (FFR_{ct} = 0,74) (C). Mesure de la perfusion myocardique par imagerie PET au repos (d), à l'effort (e) démontrant la présence d'une région hypoperfusée (flèche). Etude de la perfusion myocardique par IRM à l'effort présentant un défaut de perfusion (flèche) (f). Fusion d'images SPECT/CT démontrant la présence de sténose dans l'intermédiaire et la diagonale (flèches blanches) avec un défaut de perfusion du myocarde (flèche bleu) correspondant, dans la paroi antérolatérale (g) (Dweck et al., 2016).

Avec l'émergence de la mécanique des fluides numériques, il est devenu possible en un seul test d'effectuer une analyse anatomo-fonctionnelle des artères coronaires, afin d'améliorer la distinction entre les patients devant bénéficier ou non d'une angiographie, aboutissant ou non sur une procédure de revascularisation. Basé sur l'étude PROMISE, Lu et al. ont évalué en plus de la sténose anatomique, le retentissement fonctionnel des sténoses coronaires par la mesure de la FFR_{ct} chez des patients présentant une angine de poitrine stable (suspicion de maladie coronaire), comparée à l'angiographie coronarienne invasive basée sur la mesure de la sténose anatomique (Lu et al., 2017). Leur étude démontre l'intérêt d'ajouter à la stratégie d'évaluation anatomique par CTA des sténoses, la mesure de FFR_{ct}, afin d'améliorer l'évaluation du risque cardiovasculaire des patients coronariens, avec pour conséquence une augmentation du nombre de patients nécessitant une angiographie (passant de 49% à 61%).

La caractérisation de la plaque d'athérome, et plus particulièrement l'identification des plaques d'athérome vulnérables par CCTA, a été suggérée comme étant associée à la présence de SCA par la mesure de 4 paramètres (Motoyama et al., 2009 ; Puchner et al., 2014 ; Park et al., 2015) :

- le volume de la plaque, permettant d'apprécier le remodelage positif (PR),
- une faible atténuation (<30 HU), marqueur de la présence d'un cœur lipidique et nécrotique (LAP, Low Attenuation Plaque),
- des particules calciques (<3mm),
- la présence d'un anneau ("napkin ring").

Le scanner coronaire apparaît donc comme une modalité d'imagerie à fort potentiel dans l'évaluation non invasive des sténoses artérielles coronaires et de l'identification des patients à haut risque, de par son caractère multiparamétrique (anatomique et fonctionnel). Il reste néanmoins à réaliser des études cliniques à plus grande échelle afin de valider l'efficacité de cet outil diagnostique non invasif.

IV.B.1.2 Imagerie échographique

Cette modalité d'imagerie consiste en l'émission d'ondes ultrasonores au sein d'un tissu biologique et du traitement des ondes réfléchies. La résolution spatiale de l'imagerie échographique dépend de la fréquence des ondes émises et donc de leur longueur d'onde. Plus la résolution spatiale augmente, plus la pénétration tissulaire diminue. L'échographie transthoracique permet de visualiser les cavités, les parois, et les valves cardiaques. La charge athéromateuse peut être évaluée par la mesure de l'épaisseur intima-media carotidienne (cIMT, carotid media intima thickness). Il est également possible d'identifier les plaques d'athérome. En effet, l'échogénicité des structures traversées est corrélée à leurs caractéristiques histologiques. Des plaques fortement lipidiques seront peu échogènes tandis que les plaques fibreuses le seront plus. La présence de calcifications est visible par la formation d'un cône d'ombre, dû à la réflexion des ondes par ce tissu.

L'imagerie échographique des artères carotides en B-mode permet d'apprécier l'épaisseur intima-media et ainsi de déterminer le cIMT. Celui-ci permet de détecter la formation de lésions précoces et le remodelage vasculaire. Par sa

mesure non invasive et rapide à l'aide d'un échographe à haute résolution, cet indice est un prédicteur indépendant du risque cardiovasculaire (Lorenz et al., 2007). En effet, l'augmentation du cIMT a été associée à une augmentation du risque d'évènements cardiovasculaires (Peters et al., 2013). En comparaison au CACs, l'IMT a été démontré pour être moins prédictif d'évènement cardiovasculaire à l'échelle d'une population, alors que pour un individu, il semblerait plus pertinent (Lorenz et al., 2010). Néanmoins, des études

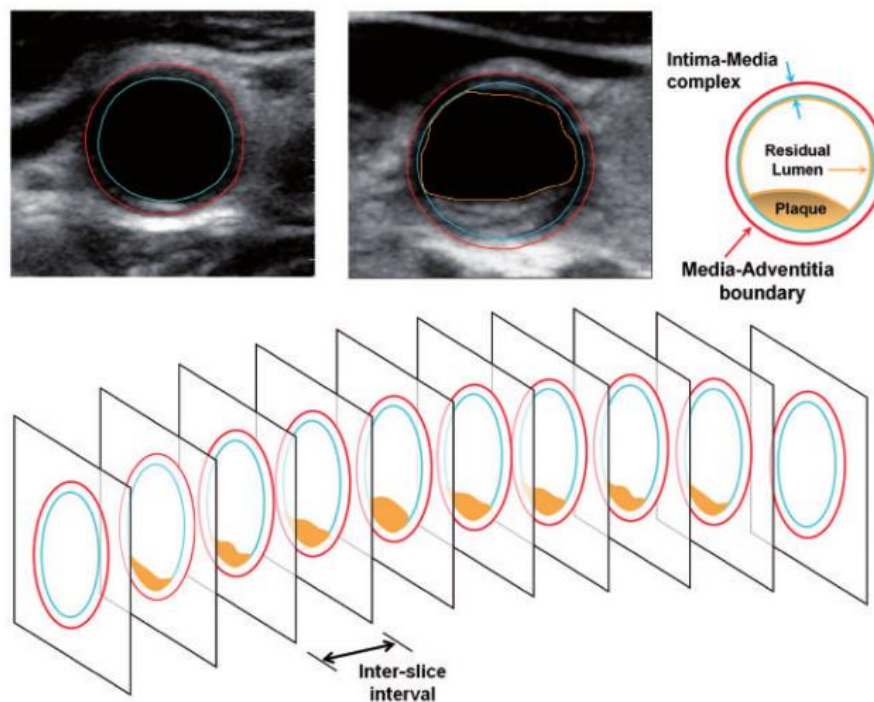


Figure 62 : Evaluation de l'épaisseur et de la charge d'une plaque permettant de déterminer le cPB et le cPT. Segments de plaques carotidiennes (orange) scannées à l'aide d'un transducteur linéaire permettant d'obtenir des images en coupes transversales (haut). Chaque image est analysée par un logiciel semi-automatisé permettant de quantifier la surface de plaque, l'intensité de niveau de gris, le pourcentage de sténose et d'autres paramètres d'intérêt. La ligne bleue représente la frontière entre l'intima et la média ; la rouge entre la média et l'adventice. En présence de lésions athéromateuses, la ligne jaune représente la frontière entre la plaque et la lumière (Sillesen et al., 2017).

suggèrent que l'évaluation de la surface des lésions athéromateuses carotidiennes par les mesures de paramètres tels que le "carotid plaque burden" (cPB) ou du "maximum carotid plaque thickness" (cPTmax) seraient des marqueurs prédictifs indirects bien plus pertinents que l'IMT dans l'évaluation du risque cardiaque chez des patients asymptomatiques (Figure 62) (Sillesen et al., 2017). Le cPB consiste à faire la sommation de la surface des lésions tout au long de la carotide, et est exprimé en mm², tandis que l'épaisseur de la plaque carotidienne (cPTmax) est déterminée par la mesure de la distance radiale entre la frontière de la media/adventice jusqu'au centre du vaisseau. Dans l'étude

BioImage, Sillesen et al. ont montré chez plus de 6 000 patients asymptomatiques, pour qui une évaluation des facteurs de risque conventionnels et une mesure d'imagerie carotidienne par ultrasons ont été effectuées, une meilleure valeur prédictive de ces 2 paramètres (cPB et cPTmax) en comparaison de l'IMT. Plus spécifiquement, l'ajout du CAC ou du cPB aux facteurs de risque traditionnels permet d'améliorer la prédiction du risque cardiovasculaire et la reclassification des patients à des niveaux similaires (Baber et al., 2015). Les auteurs concluent que la mesure de ces 2 paramètres pourrait grandement améliorer la prédiction du risque d'évènements cardiovasculaires liés à l'athérosclérose.

IV.B.1.3 L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

Cette technique repose sur le principe de la résonance magnétique nucléaire. Les noyaux de certains atomes, notamment l'hydrogène, lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique, vont voir leur moment magnétique de spin s'aligner. Le retour à l'équilibre, appelé temps de relaxation des spins nucléaires, est caractérisé par une émission d'énergie sous la forme d'ondes de radiofréquences, qui sont décomposées en deux types différents en fonction de l'agitation moléculaire du milieu observé :

- Temps de relaxation longitudinal, T1 (repousse de la composante longitudinale),
- Temps de relaxation transversal, T2 (chute de l'aimantation transversale).

Ainsi, le signal enregistré par l'IRM provenant des ondes de radiofréquences émises par les molécules d'eau va être convertie. Le codage spatial de l'image est effectué à l'aide de gradients qui vont traduire sous forme fréquentielle la position des voxels. La transformée de Fourier va permettre de convertir ces données fréquentielles en informations spatiales, interprétables.

En fonction de la zone que l'on souhaite observer, il est parfois nécessaire d'augmenter le contraste, soit en augmentant le temps d'acquisition, soit par l'injection d'un produit de contraste.

L'avantage de cette modalité est bien entendu l'absence de radiations ionisantes, sa résolution spatiale élevée, et son aspect multiparamétrique.

En cardiologie, cette modalité est principalement utilisée afin d'explorer les conséquences cliniques de la présence d'une ischémie coronarienne (Greenwood et al., 2012).

En comparaison au CT, l'IRM possède une caractérisation supérieure des tissus mous contenus au sein des lésions athéromateuses, avec une absence de radiation ionisante. En revanche, l'imagerie des artères coronariennes par cette technique reste difficile, due à la présence d'artéfacts induits par les mouvements durant les acquisitions prolongées, et à une résolution inférieure à celle du CT. La visualisation des plaques carotidiennes en IRM en présence de gadolinium a été rapportée dans certaines études comme permettant d'évaluer la taille du cœur lipidique (Cai et al., 2005), la vascularisation intra-plaque (Kerwin et al., 2003), et l'intégrité de la chape fibreuse (Yuan et al., 2002).

IV.B.2 *Imagerie moléculaire*

L'imagerie moléculaire repose sur l'utilisation d'agent de contraste ciblant un processus moléculaire spécifique. Il peut être détecté par différentes modalités que sont l'IRM, l'échographie, la SPECT, la TEP et l'optique.

Dans cette brève revue bibliographique, je me focaliserai sur les agents d'imagerie actuellement en recherche clinique et développés pour l'imagerie nucléaire.

L'imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire est une imagerie fonctionnelle qui repose sur l'injection de traceurs radioactifs, responsables de l'émission de rayonnements ionisants, et dont la détection externe, non invasive, est réalisée à l'aide de gamma caméra. L'imagerie nucléaire est associée à 2 modalités d'imagerie que sont la "single photon emission computed tomography" (SPECT) et la "positron emission tomography" (PET), qui sont employées en fonction du type de radioélément utilisé, et permettent toutes les deux d'obtenir une image tomographique.

La caméra SPECT est une γ -caméra équipée de radio-détecteurs avec un système de collimation permettant d'obtenir une image suivant la projection considérée. Le technétium 99m (^{99m}Tc), un émetteur de rayonnements gamma

pur, est un radioisotope de courte demi-vie (6h), couramment utilisé en imagerie SPECT.

Les radioisotopes utilisées pour l'imagerie PET sont des émetteurs de particules β^+ ayant une pénétration tissulaire comprise entre 1 et 5 mm avant de rencontrer un électron pour produire un événement d'annihilation. Deux photons de haute énergie (511 keV chacun) vont être émis à un angle de 180° . Le système de détection comprend un anneau enregistrant l'arrivée simultanée de ces 2 photons et rejetant les autres.

Ces 2 modalités d'imagerie nucléaire possèdent des sensibilités de l'ordre du picomolaire. Afin de pallier l'absence de repères anatomiques due à une résolution spatiale relativement faible, l'imagerie multimodale est utilisée, associant à l'imagerie nucléaire, le CT ou l'IRM.

Les méthodes conventionnelles de quantification sont le "standardized uptake value" (SUV) et le "tissue to background ratio" (TBR). La SUV représente le rapport entre la concentration en radiotracteur au sein d'une région d'intérêt sur l'activité totale injectée, ajustée de la masse corporelle, et peut être analysée en SUVmax (maximale) ou SUVmean (moyenne). Le TBR correspond au rapport entre la SUV de la paroi vasculaire divisée par la SUV dans la zone médiane d'une artère saine (Tawakol et al., 2006).

IV.B.2.1 Traceurs des processus inflammatoires dans l'athérosclérose

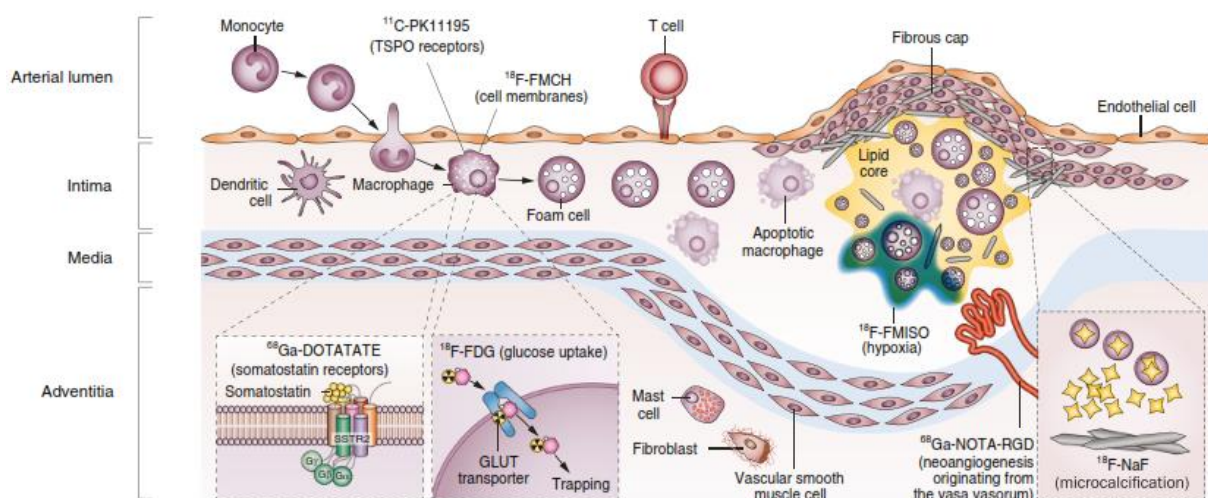


Figure 63 : Cibles moléculaires des traceurs PET pour l'imagerie des phénomènes inflammatoires dans l'athérosclérose (Joseph et Tawakol, 2016).

Au sein des lésions avancées, les macrophages en apoptose vont libérer leurs lipides membranaires et leur contenu intra-cytoplasmique, provoquant une augmentation de l'hypoxie, la formation de néovaisseaux, et le développement de microcalcifications. La libération de protéases dégradant les protéines de la MEC fragilise la chape fibreuse, conférant à ces plaques un phénotype vulnérable, à haut risque cardiovasculaire. Ces processus physiologiques sont des cibles potentielles pour l'imagerie fonctionnelle de l'inflammation, impliquée dans l'athérosclérose (Figure 63).

IV.B.2.1.1 *Les macrophages*

IV.B.2.1.1.1 ^{18}F -FDG

Le 2- ^{18}F -fluoro-2-déoxy-D-glucose (^{18}F -FDG) est un analogue du glucose, qui s'accumule dans les cellules métaboliquement actives, notamment les macrophages pro-inflammatoires, grâce aux transporteurs du glucose, les GLUTs. En effet, la glycolyse est nettement augmentée dans les macrophages M1 (pro-inflammatoires) activés en comparaison des macrophages de type M2 (Rodriguez-Prados et al., 2010). Ce traceur est approuvé en clinique pour la détection des métastases/tumeurs, et depuis de nombreuses années en cours d'évaluation pour l'imagerie des plaques d'athérome vulnérables. La première étude mettant en évidence une accumulation de ^{18}F -FDG reflétant un risque accru d'évènement cardiovasculaire a été réalisée par Rudd et al. en 2002 (Rudd et al., 2002). Celle-ci a été confirmée par Tawakol et al., en 2006, qui ont mis en évidence une forte corrélation entre la fixation de ^{18}F -FDG et la présence de macrophages au sein des plaques après endartériectomie (Tawakol et al., 2006). Le ^{18}F -FDG permet d'évaluer l'efficacité de thérapies anti-athérogènes et d'obtenir des mesures hautement reproductibles (Rudd et al., 2007 ; Tawakol et al., 2013). Ces résultats prometteurs, au niveau des plaques carotidiennes, sont plus controversés pour les artères coronaires (Figure 64). En effet, la captation du ^{18}F -FDG par le myocarde, le faible diamètre des artères coronaires, et les mouvements cardiaques limitent son utilisation. De plus, sa captation médiée par le métabolisme glucidique en fait un marqueur non spécifique de l'inflammation au sein des lésions athéromateuses. En outre, sa fixation est également influencée par l'hypoxie (Folco et al., 2011), et la microcirculation (Taqueti et al., 2014). Néanmoins, ce traceur a été utilisé dans l'évaluation de thérapies anti-

athérogènes, par la mesure de l'inflammation vasculaire, fournissant des valeurs pertinentes sur le développement de la pathologie. La première classe thérapeutique testée a été les statines, pour lesquelles un effet dose-dépendant sur la réduction de la captation artérielle de ^{18}F -FDG a été observé, en accord avec les propriétés anti-inflammatoires de ces médicaments (Joseph et Tawakol, 2016). Dans l'étude DAL-PLAQUE (Fayad et al., 2011), l'absence d'effet d'un inhibiteur de la CETP sur la réduction de la captation de ^{18}F -FDG, suggérant l'absence d'effet antiathérogène notable, a été confirmé dans l'étude DAL-OUTCOMES, dans laquelle le Dalcétrapib n'a pas réduit de manière significative les critères du jugement principal (revascularisation, IMA, AVC et mortalité cardiovasculaire) et/ou secondaire (Schwartz et al., 2012).

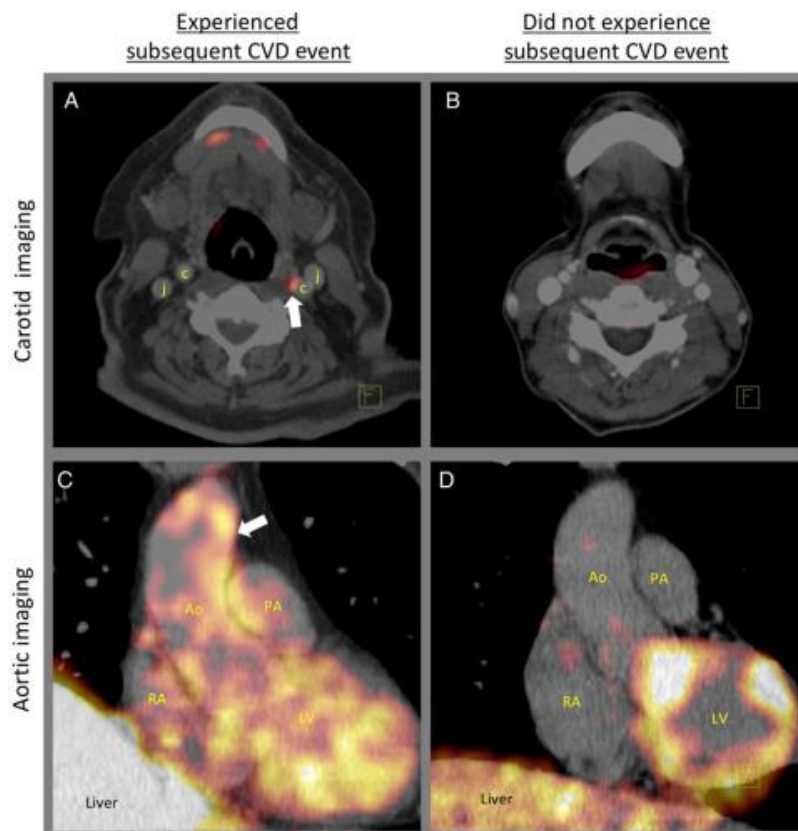


Figure 64 : Images PET d'une captation importante et faible de ^{18}F -FDG chez 4 individus. Captation importante de ^{18}F -FDG au sein de l'artère carotidienne gauche (flèche), tandis que le patient B ne présente aucun signal. Le patient C présente une importante captation aortique de ^{18}F -FDG, contrairement au patient D. Les patients A et C ont eu un évènement cardiovasculaire ultérieur (Joseph et Tawakol, 2016).

Son manque de spécificité, associé à une captation importante par le myocarde, a conduit à développer des traceurs alternatifs, ciblant plus spécifiquement le processus inflammatoire dans l'athérosclérose.

Ce radiotracteur cible le sous-type 2 du récepteur à la somatostatine (SSR2), exprimé exclusivement à la surface des macrophages de type M1, pro-inflammatoires. Des études précliniques ont confirmé la supériorité, en termes de spécificité de fixation aux macrophages, de l'imagerie au ⁶⁸Ga-DOTATATE par rapport au ¹⁸F-FDG chez un modèle murin d'athérosclérose (Li et al., 2012). Une étude prospective récente (VISION) s'est intéressée à comparer l'efficacité de ces 2 agents d'imagerie, ¹⁸F-FDG vs DOTATATE, dans la détection de l'inflammation au sein de lésions athéromateuses présentes au niveau des artères coronaires ou carotidiennes (Tarkin et al., 2017). Les patients "stables" ont été définis par la présence d'un angor stable ou d'une athérosclérose asymptomatique, avec au moins une sténose >30% sur l'un des 3 troncs épicaudiques ou au niveau de l'artère carotidienne, tandis que les patients "instables" étaient des individus victimes d'un évènement clinique (SCA, ou AVC/AIT) dans les 3 mois précédant l'imagerie. Les résultats de cette étude ont démontré que l'imagerie de l'inflammation par l'utilisation du ⁶⁸Ga-DOTATATE permettait l'identification des lésions athéromateuses symptomatiques (SCA, AIT/AVC), qu'elles soient au niveau coronarien ou carotidien, avec une supériorité dans la discrimination des plaques à haut risque vs à faible risque cardiovasculaire en comparaison du ¹⁸F-FDG (Figure 65). La fixation spécifique du ⁶⁸Ga-DOTATATE aux macrophages pro-inflammatoires offre de nouvelles perspectives dans la classification des patients nécessitant une stratégie thérapeutique plus agressive, et dans l'exploration de nouvelles pathologies inflammatoires cardiovasculaires. Néanmoins, son coût élevé par rapport au ¹⁸F-FDG ne peut justifier son utilisation en pratique clinique à l'heure actuelle.

Le DOTATATE a également été radiomarqué au ⁶⁴Cu, possédant une demi-vie plus longue (12,7 h vs 68 min) et un parcours des positons plus court que le ⁶⁸Ga, dans l'objectif de potentiellement améliorer la résolution spatiale et d'effectuer l'acquisition des images sur des temps plus longs. Dans cette étude publiée en 2015 dans le journal ATVB, Pedersen et al. ont observé une fixation plus importante du ⁶⁴Cu-DOTATATE au sein des lésions athéromateuses carotidiennes en comparaison d'artères saines (Pedersen et al., 2015). En revanche, une corrélation modérée entre la fixation du ⁶⁴Cu-DOTATATE à des

temps courts (85 min post-injection) vs longs (300 min) a été observée, révélant le faible intérêt de réaliser des acquisitions prolongées.

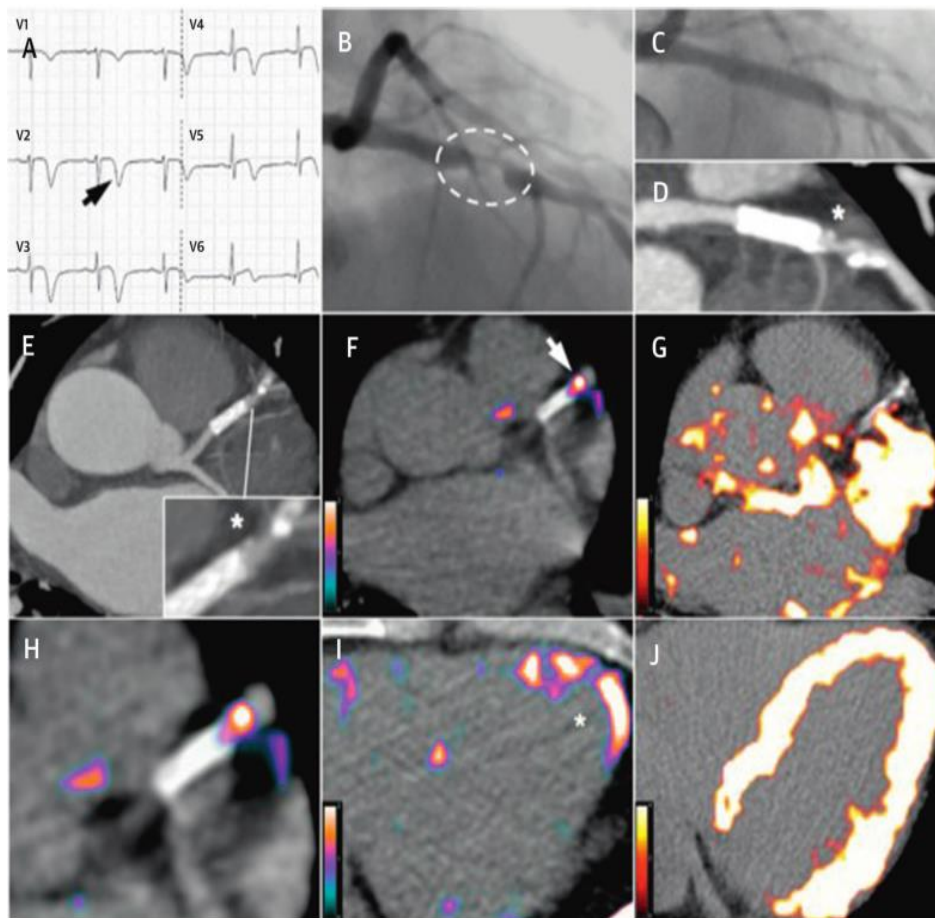


Figure 65 : Comparaison de l'inflammation coronarienne par l'imagerie PET entre le ^{68}Ga -DOTATATE et le ^{18}F -FDG. Images chez un sujet âgé de 57 ans présentant un SCA avec une inversion de l'onde T (flèche) sur l'électrocardiogramme (A) et un taux de troponine-I à 4,65 ng/L. Présence d'une lésion sténosante responsable de l'ischémie sur l'inter-ventriculaire antérieure identifiée par coronarographie (B, pointillés). Après intervention coronarienne percutanée et pose d'un stent (C), une plaque résiduelle (*) à haut risque (faible atténuation et microcalcification punctiforme) est visible par angiographie (D, E). ^{68}Ga -DOTATATE permet la détection de l'inflammation intense au niveau de la lésion athéromateuse à haut risque (flèche) en aval du stent (F, H, I). En revanche, l'imagerie au ^{18}F -FDG (G, J) présente un bruit de fond important, ne permettant pas de visualiser les artères coronaires (Tarkin et al., 2017).

IV.B.2.1.1.3 ¹¹C-PK11195

¹¹C-PK11195 (18 kDa) est un ligand de la protéine de la translocation (TSPO), également connue sous le nom de récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR), principalement impliquée dans la translocation du cholestérol au sein des mitochondries. Cette protéine est fortement exprimée par les macrophages. Ce traceur PET est utilisé en recherche médicale pour l'imagerie de la neuro-inflammation. Des études chez l'homme ont rapporté une fixation carotidienne significativement plus importante de ce traceur chez des patients symptomatiques (AVC/AIT) (n=9) en comparaison d'individus asymptomatiques (n=26) présentant tous des sténoses >50% (Gaemperli et al., 2012). La demi-vie courte de ce radiotracer (20 min) nécessite la présence d'un cyclotron à proximité, limitant ainsi son utilisation. D'autres ligands de TSPO radiomarqués au ¹⁸F sont en cours de développement afin de s'affranchir de ces limitations. Des études précliniques sur des ligands de TSPO de 3^{ème} génération radiomarqués au ¹⁸F (¹⁸F-GE-180) ont démontré une spécificité plus importante de fixation au sein de régions présentant une neuro-inflammation en comparaison du ¹¹C-PK11195 (Dickens AM et al., 2014). Chez un modèle murin d'athérosclérose (LDLR^{-/-}/ApoB^{100/100}), l'utilisation de ¹⁸F-GE-180 n'a pas permis de discriminer la présence d'inflammation entre des artères saines et des artères athéromateuses (Hellberg et al., 2018).

IV.B.2.1.1.4 ¹⁸F-FCH

La choline est le précurseur clé de la phosphatidylcholine, un phospholipide majeur de la composition des membranes cellulaires, faisant de cette molécule un marqueur de la prolifération et de l'activité cellulaire. La ¹⁸F-Fluorocholine est fortement captée par les cellules tumorales au fort pouvoir prolifératif, mais également par les macrophages impliqués dans le processus inflammatoire. Elle est utilisée en routine dans le bilan des récives biologiques des cancers de la prostate. Dans l'athérosclérose, des études précliniques effectuées chez la souris ont mis en évidence l'intérêt de ce radiotracer dans l'imagerie du processus inflammatoire des lésions athéromateuses (Matter et al., 2005). Chez l'homme, une récente étude effectuée sur 10 patients avec une endartériectomie carotidienne programmée a montré une corrélation positive entre la fixation de

^{18}F -FCH et l'infiltration des macrophages au sein des lésions athéromateuses (Figure 66) (Vöö et al., 2016).

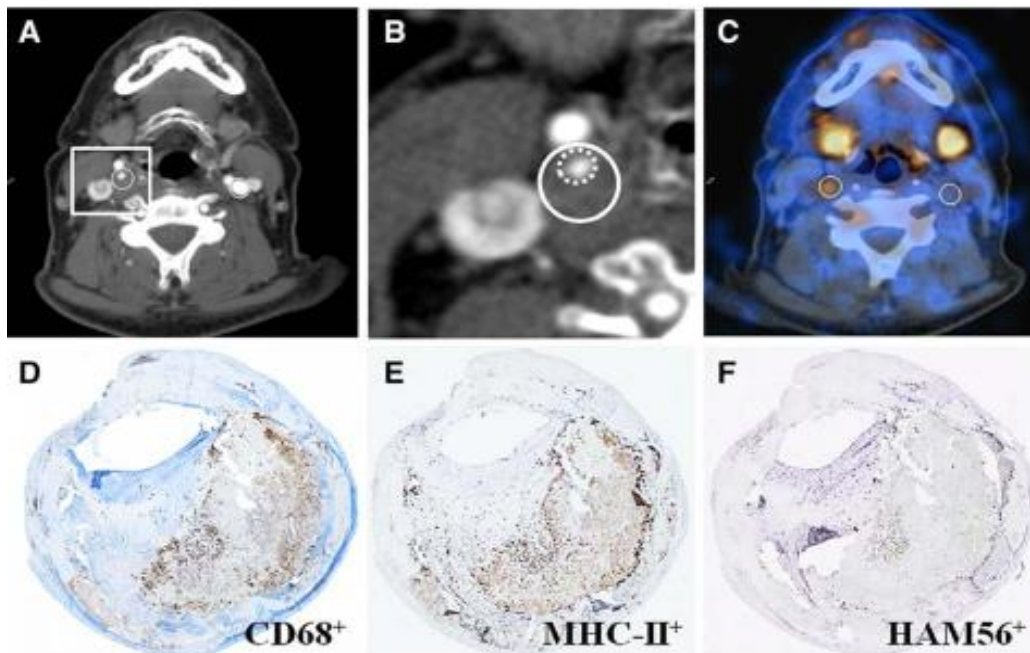


Figure 66 : Images représentatives PET/CT de ^{18}F -FCH (A, B, C) et des colorations immunohistologiques correspondantes (D, E, F) de coupes transversales de segments d'endartériectomie chez un patient présentant une plaque symptomatique sur l'artère carotide droite et asymptomatique sur la carotide gauche. Une intense captation est visible sur l'imagerie PET/CT, dont la quantification a révélé une fixation 2 fois plus importante au sein de la lésion symptomatique en comparaison de la lésion controlatérale (2,46 vs 1,18). La présence de macrophages a été révélée par immunohistologie (D, E et F) (Vöö et al., 2016).

IV.B.2.1.2 Hypoxie

L'hypoxie est importante dans le développement des lésions athéromateuses. En effet, au fur et à mesure que la lésion progresse, leur cœur devient de plus en plus hypoxique, induisant l'infiltration de cellules de l'immunité, elles-mêmes consommatrices d'oxygène, aggravant le phénomène d'hypoxie. En réponse à ces conditions, des micro-vaisseaux se forment, et qui donneront lieu à la formation de plaques hémorragiques, marqueurs de vulnérabilité.

IV.B.2.1.2.1 ^{18}F -fluoromisonidazole (^{18}F -FMISO)

Les nitroimidazoles sont des molécules électrophiles, s'accumulant préférentiellement au sein des cellules hypoxiques (Chapman et al., 1984). Le ^{18}F -FMISO est le plus utilisé des agents d'imagerie appartenant à la classe des nitroimidazoles. Utiliser dans un premier temps en oncologie, celui-ci est depuis peu de temps évalué dans l'imagerie des lésions athéromateuses. Dans un modèle d'athérosclérose chez le lapin, l'augmentation de la fixation de ^{18}F -FMISO a été observée chez ces animaux sous régime hypercholestérolémiant en comparaison des animaux contrôles, et cette fixation a été corrélée aux régions hypoxiques, révélées par immunohistologie (Mateo J, 2014). Joshi et al. ont quantifié pour la première fois chez l'homme, dans une étude clinique prospective récente incluant 16 patients présentant un événement cardiovasculaire récent (AIT ou AVC), la fixation du ^{18}F -FMISO (Joshi et al., 2017). Celle-ci a été légèrement supérieure au sein des lésions symptomatiques en comparaison de lésions controlatérales asymptomatiques, et cette fixation a été corrélée à l'activité du ^{18}F -FDG (Figure 67). Ces résultats suggèrent que l'hypoxie contribue fortement à l'activité inflammatoire des lésions athéromateuses et à la fixation du ^{18}F -FDG. Le ^{18}F -FMISO est un outil à fort potentiel dans la compréhension des mécanismes de progression de l'athérosclérose associés à l'hypoxie, notamment dans son caractère vulnérable (Sluimer et al., 2008).

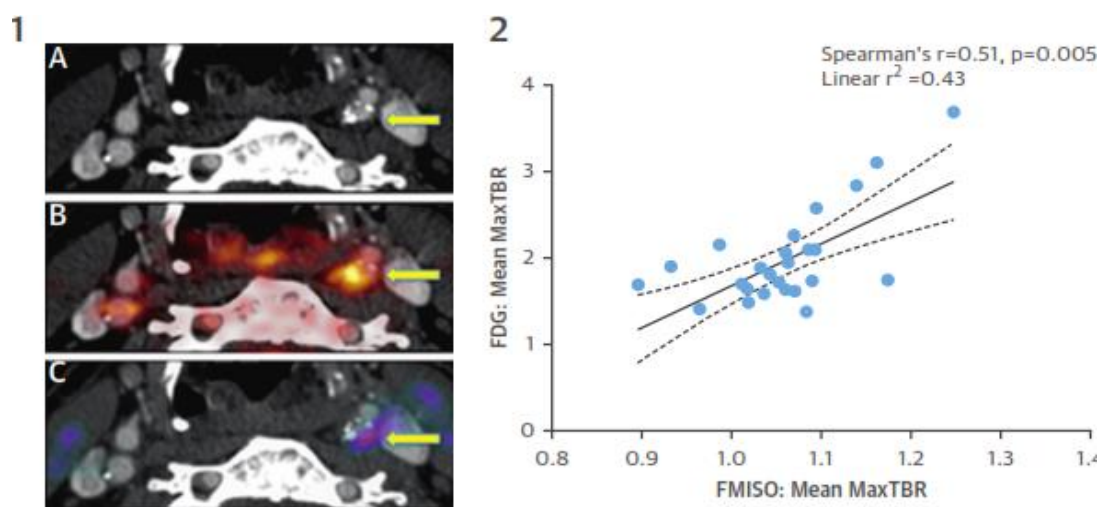


Figure 67 : Images PET/CT d'une lésion athéromateuse carotidienne (flèche jaune) responsable d'un AVC. Sténose au niveau de l'artère carotide interne gauche détectée par CCTA (A). Image au ^{18}F -FDG fusionnée avec l'image CT. Captation intense du ^{18}F -FDG au niveau de la lésion coupable (B). Image au ^{18}F -FMISO. Fixation élevée de ^{18}F -FMISO reflétant une hypoxie importante intraplaque (C). Les captations carotidiennes de ^{18}F -FDG et de ^{18}F -FMISO sont corrélées positivement (2). TBR= Target to background (Joshi et al., 2017).

IV.B.2.1.2.2 ^{18}F -HX4

Développé pour l'imagerie des tumeurs hypoxiques, cet analogue du 2-nitroimidazole présente des caractéristiques proches de celles du ^{18}F -FMISO. Dans une étude publiée en 2015 par Van der Valk et al., une fixation de ^{18}F -HX4 significativement plus importante a été observée dans des segments carotidiens présentant des lésions athéromateuses en comparaison de zones carotidiennes saines, suggérant le rôle important joué par l'hypoxie dans l'athérosclérose (Van der Valk et al., 2015).

IV.B.2.1.3 Récepteur aux chimiokines

IV.B.2.1.3.1 ^{68}Ga -Pentixafor

Cet agent d'imagerie PET a été récemment utilisé en clinique chez des patients présentant un syndrome myéloprolifératif. Il présente une haute affinité pour le récepteur CXCR4, qui est exprimé par de nombreuses cellules de l'inflammation, incluant les monocytes/macrophages mais également les progéniteurs des CMLs et des CEs. Cet agent d'imagerie a été évalué dans un premier temps dans différentes tumeurs exprimant CXCR4 chez des modèles animaux. La preuve de concept de cet agent d'imagerie a été récemment réalisée chez des patients présentant un lymphome ou un myélome multiple (Philipp-Abbrederis et al., 2015).

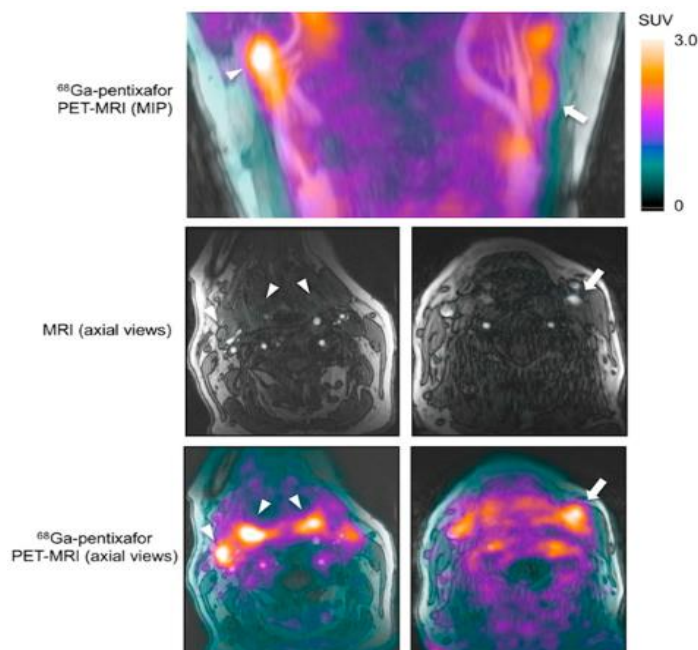


Figure 68 : Imagerie PET/IRM au ^{68}Ga -pentixafor de lésions athéromateuses carotidiennes humaines. Exemple représentatif chez un patient présentant une accumulation focale de ^{68}Ga -pentixafor (flèches) par imagerie PET/IRM. Il est intéressant d'observer une forte accumulation au niveau des ganglions lymphatiques périphériques et de l'amygdale (triangles) (Hyafil et al., 2017)

L'expression de CXCR4 est également fortement augmentée dans des conditions d'hypoxie induites par l'HIF. L'intérêt de cibler CXCR4 dans le contexte de l'athérosclérose a donc été investigué, plus précisément dans la détection des plaques vulnérables qui présentent une inflammation importante associée à des conditions hypoxiques. Dans un modèle d'athérosclérose chez le lapin, l'imagerie du ^{68}Ga -pentixafor a permis d'évaluer l'expression de CXCR4 et ceci a été confirmée chez l'homme, au sein de lésions athéromateuses carotidiennes sur un faible nombre d'individus (Hyafil et al., 2017) (Figure 68).

IV.B.2.1.4 *Apoptose*

L'apoptose est impliquée à plusieurs niveaux dans la vulnérabilité de la plaque. L'apoptose des CMLs est en partie responsable de l'amincissement de la chape fibreuse, tandis que l'apoptose des macrophages est responsable de la formation du cœur lipidique volumineux. L'externalisation des phosphatidylsérines à la surface de la membrane plasmique est une caractéristique des cellules en apoptose.

IV.B.2.1.4.1 *Annexine V*

L'annexine possède une haute affinité pour les phosphatidylsérines membranaires exposées par les cellules apoptotiques. Ce marqueur a été utilisé dans un premier temps en oncologie, puis étudié dans l'insuffisance cardiaque et dans l'athérosclérose. Une étude pilote publiée en 2004 a mis en évidence l'intérêt de l'imagerie de l'annexine V radiomarquée au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ dans l'évaluation de l'instabilité des plaques (Kietselaer et al., 2004).

IV.B.2.1.5 *Angiogenèse*

La néovascularisation intra-plaque est considérée comme l'un des marqueurs de l'instabilité des plaques. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est exprimée par les macrophages, les CMLs de l'intima, et les CEs des *vasa vasorum* et des microvasculatures intra-plaques des artères coronaires.

IV.B.2.1.5.1 Ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Le tri-peptide arginine-glycine-acide aspartique (RGD) possède une haute affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Développé initialement pour l'oncologie, son utilisation a été étendue pour l'imagerie des plaques vulnérables. Une étude réalisée en 2014 par Beer et al., a montré que le ^{18}F -galacto-RGD s'accumulait préférentiellement au sein de lésions athéromateuses carotidiennes chez des patients à haut grade de sténose carotidienne (>70%). De plus, sa fixation corrèle à l'expression de sa cible sur les prélèvements d'endartériectomie, mais pas à la densité en micro-vaisseaux, ni en macrophages (Beer et al., 2014).

Plus récemment, l'imagerie PET au ^{18}F -Flucilatide, couplée à l'IRM a été utilisée afin d'établir si l'imagerie de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ permettait d'évaluer le processus de réparation du myocarde en post-infarctus (Jenkins et al., 2017). Les résultats positifs de cette étude suggèrent que celle-ci pourrait servir de biomarqueur dans l'évaluation de thérapies visant à accélérer le processus de réparation post-infarctus. Les données concernant la captation au sein de la paroi vasculaire ne sont pas encore publiées.

IV.B.2.1.6 Micro-calcifications

IV.B.2.1.6.1 ^{18}F -sodium fluoride (^{18}F -NaF)

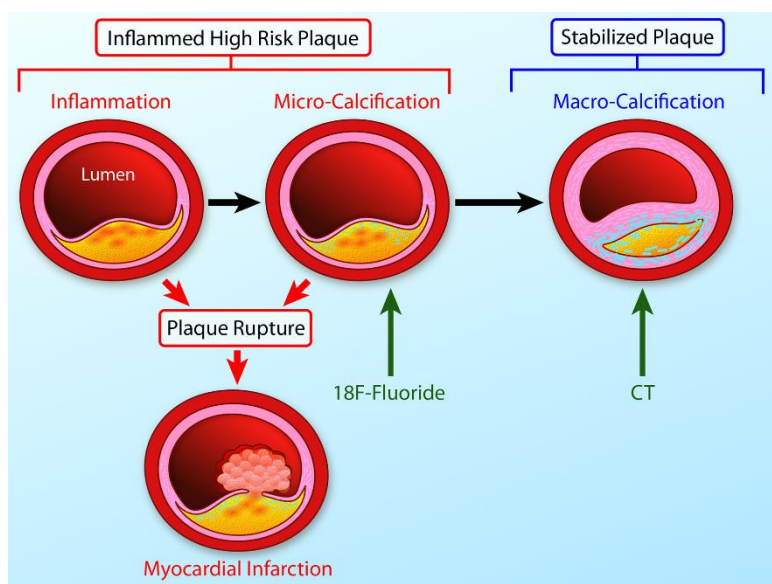


Figure 69 : Lien entre l'inflammation, les microcalcifications et les macrocalcifications (Dweck et al., 2016).

Le processus calcique détecté par l'imagerie anatomique rend compte de lésions stables par la présence de macro-calcifications et permet de déterminer le score calcique (CACs), reflet de la charge athérosclérotique globale d'un patient. En revanche, la présence de micro-calcifications (5-60 μm), correspondant au stade précoce du processus

de guérison de la plaque, a été associée à l'instabilité des plaques, induisant leur rupture (Figure 69) (Vengrenyuk et al., 2006). Le ^{18}F -NaF est utilisé depuis de nombreuses années comme marqueur de l'augmentation du métabolisme osseux. Il s'échange avec le groupement hydroxyle présent sur les hydroxyapatites, composant clé de la calcification osseuse et vasculaire. Dweck et al. ont rapporté une captation coronaire importante du ^{18}F -NaF chez des patients présentant un historique d'évènements coronaires et un score de risque élevé. De plus, l'augmentation de la fixation du ^{18}F -NaF a été démontrée au sein de lésions coupables, carotidiennes et coronariennes (Figure 70). Sa fixation au sein de lésions aux phénotypes instables a été confirmée dans une étude publiée en 2017 par Lee et al., dans laquelle les plaques ont été caractérisées par différentes modalités d'imagerie (IVUS, OCT et CCTA) permettant d'identifier et de localiser les lésions possédant des caractéristiques à haut risque (inflammation, remodelage positif, cœur nécrotique) (Lee et al., 2017). Ces données suggèrent que le ^{18}F -NaF pourrait être un outil efficace dans la détection des plaques instables chez des patients à haut risque cardiovasculaire. Dans le but d'évaluer la valeur ajoutée de ce radiotraceur dans la stratification du risque cardiovasculaire en comparaison des scores de risque conventionnels et de l'imagerie CT, une étude prospective multicentrique PREFFIR (NCT02278211) a été initiée et s'achèvera en 2024, chez 700 patients hospitalisés pour un IMA et dont l'angiographie a démontré une maladie coronaire pluritronculaire, avec un suivi sur 5 ans.

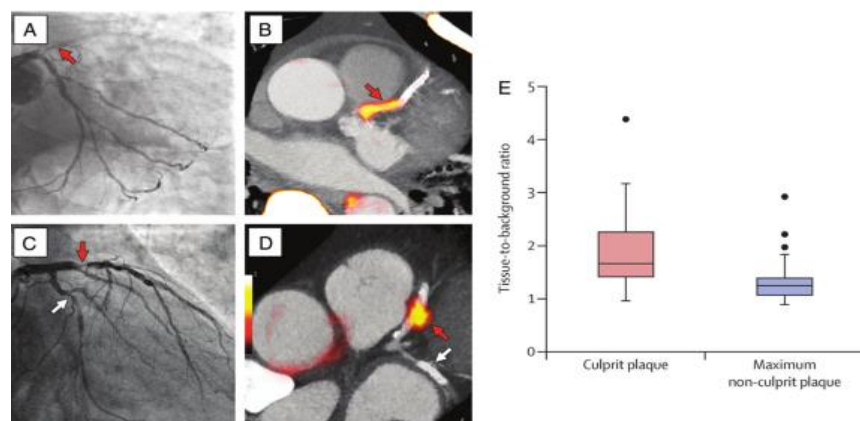


Figure 70 : La fixation du ^{18}F -NaF augmente au sein des lésions coronariennes coupables chez des individus récemment victimes d'un IMA. Les régions de sténoses serrées sont indiquées par une flèche rouge sur l'angiographie effectuée sur 2 patients différents (A, C). L'imagerie, au ^{18}F -NaF chez ces individus, présente un signal intense au niveau des lésions coupables, situées sur l'artère antérieure descendante gauche (B, D). Les quantifications des images (E), exprimées en "target to background ratio" (TBR), démontrent que la fixation du ^{18}F -NaF est plus importante dans les lésions coupables en comparaison des vaisseaux asymptomatiques (Joshi et al., 2014).

De nombreuses avancées ont été réalisées durant ces dernières années dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'athérosclérose, permettant d'identifier certains critères spécifiques des plaques d'athérome vulnérables sujettes à la rupture. Ces critères (morphologiques ou moléculaires) ont servi au développement des modalités d'imagerie d'aujourd'hui, dont l'objectif est de détecter la présence de plaques vulnérables permettant de reclassifier les patients à risque intermédiaire qui nécessiteraient une stratégie thérapeutique préventive plus agressive.

Les modalités d'imagerie invasives sont pour l'instant inadaptées pour répondre à un tel objectif, de par la faible quantité de patients qui pourraient être examinés, mais elles ont néanmoins permis d'améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'athérosclérose (IVUS) et d'évaluer certaines stratégies thérapeutiques de prise en charge des patients victimes d'un SCA (OCT), notamment pour ceux dont l'érosion de plaque a été responsable de l'évènement aigu.

Les modalités d'imagerie non invasives semblent en revanche bien adaptées à de larges cohortes de patients. L'agent d'imagerie le plus utilisé actuellement en recherche clinique est le ^{18}F -FDG, notamment dans la détection de l'inflammation vasculaire carotidienne. Il est en revanche inutilisable dans la maladie coronaire, de par son manque de spécificité au sein des artères coronaires. D'autres radiotraceurs sont en cours de développement, mais aucun d'entre eux n'est actuellement utilisé en pratique clinique comme outil de stratification du risque de la maladie coronaire liée à l'athérosclérose.

V TRAVAUX ANTERIEURS

Cette brève revue des différentes modalités d'imagerie met en évidence le manque d'outils diagnostiques rendant compte spécifiquement de l'activité inflammatoire au sein des plaques. Au vu de cette problématique, un radiotracer ciblant le processus inflammatoire a été développé au Laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques (LRB). Ce radiotracer est une molécule originale dérivée d'un nanobody qui cible la molécule d'adhésion cellulaire, VCAM-1. Ce projet, initié en collaboration avec deux laboratoires de la Vrije Universiteit de Bruxelles, fait suite à des études antérieures utilisant des séquences peptidiques dérivées du CMH comme ligand de VCAM-1 (Broisat et al., 2007 ; Dimastromatteo et al., 2013).

V.A Choix de la cible : VCAM-1

VCAM-1, appelée INCAM-110 lors de sa découverte, a été identifiée pour la première fois en 1989 par 2 équipes différentes (Osborn et al., 1989 ; Rice et Bevilacqua, 1989). VCAM-1 est une glycoprotéine transmembranaire de 110 kDa dont le gène est localisé sur le chromosome 1 (Cybulsky et Gimbrone, 1991). Elle fait partie de la superfamille des immunoglobulines, composée d'un domaine intracellulaire (19 AA) conservé entre les espèces, d'un domaine transmembranaire de type I, et de plusieurs domaines extracellulaires (7, 6 ou 3). Il existe également une forme soluble de VCAM-1 (Gearing et al., 1992), générée par le clivage de la protéine par ADAM-17, qui est présente en faible quantité dans le plasma d'un individu sain, et dont l'augmentation de son taux a été observée dans diverses pathologies (IM, sclérose en plaques). L'épissage alternatif de l'ARNm de la forme complète (7 domaines) va générer l'expression de 3 isoformes différentes, 2 chez l'homme (7 et 6 domaines extracellulaires) et 2 chez la souris (7 et 3 domaines extracellulaires) (Figure 71).

V.A.1 *Expression de VCAM-1*

Son expression est régulée par le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B), SP-1, l'Ap-1 et le facteur de régulation de l'interféron 1 (Cook-Mills, Marchese, et Abdala-Valencia, 2011). A titre d'exemple, l'activation du facteur de transcription NF- κ B est induite par l'expression de certaines cytokines pro-

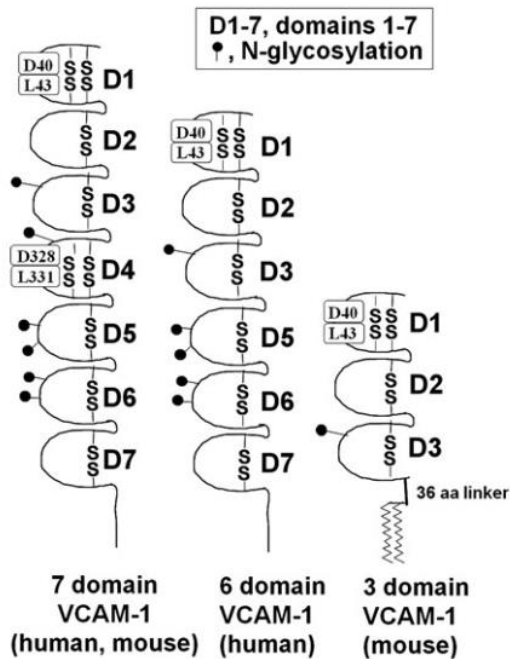


Figure 71 : Isoformes de VCAM-1 (Cook-Mills, Marchese, et Abdala-Valencia, 2011).

inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β , ou par l'activation de certains récepteurs membranaires comme TLR4 (Toll Like Receptor 4). Dans ces conditions d'induction, VCAM-1 est impliquée dans de nombreuses pathologies dont des maladies auto-immunes (sclérose en plaques, polyarthrite rhumatoïde), l'athérosclérose et les rejets de greffons. Dans le cadre du processus d'hématopoïèse extramédullaire induit par une inflammation aiguë ou systémique (athérosclérose, IM), la rétention au sein des organes lymphoïdes secondaires (e.g. rate) des cellules souches hématopoïétiques provenant de la moelle

osseuse est médiée par l'expression de VCAM-1 à la surface des macrophages (Dutta et al., 2015). Récemment, certaines études (Hynes, 2011) ont suggéré que l'expression de VCAM-1 par les cellules tumorales du sein ou du glioblastome conférait à celles-ci des capacités métastatiques accrues, par 2 mécanismes distincts :

- l'activation de la voie de signalisation de survie métastatique, induite par l'interaction entre les monocytes/macrophages et les cellules tumorales ;
- l'activation de la croissance métastatique osseuse, induite par des interactions paracrines entre les cellules tumorales dormantes et les ostéoclastes.

Dans l'athérosclérose, le rôle de VCAM-1 est majeur, puisqu'il permet l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium activé. En effet, la délétion de son domaine 4 dans un modèle murin d'athérosclérose a permis de réduire la surface des lésions de 40% (Cybulski et al., 2001). En plus de son expression par les CEs, les CMLs et les macrophages vont également exprimer cette protéine dans des plaques avancées (O'Brien et al., 1993). Son expression étant associée aux processus inflammatoires (critères de vulnérabilité des plaques), VCAM-1 apparaît comme une cible pertinente pour l'imagerie des plaques d'athérome vulnérables.

En plus de son expression induite, VCAM-1 peut être également exprimée de manière constitutive par de nombreuses cellules. En effet, les cellules stromales (cellules endothéliales, ostéoblastes, fibroblastes) constituant l'environnement médullaire des organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus) et secondaires (rate et ganglions lymphatiques) participent à la différenciation des lymphocytes B en établissant des contacts directs (VCAM-1/VLA-4) (Cook-Mills, Marchese, et Abdala-Valencia, 2011). L'expression de VCAM-1 n'est pas restreinte à ces seules cellules. Les cellules dendritiques et les cellules dendritiques folliculaires présentes à la périphérie des tissus lymphoïdes expriment également cette protéine (Ulyanova, 2005).

V.A.2 L'intégrine $\alpha_4\beta_1$, ligand de VCAM-1

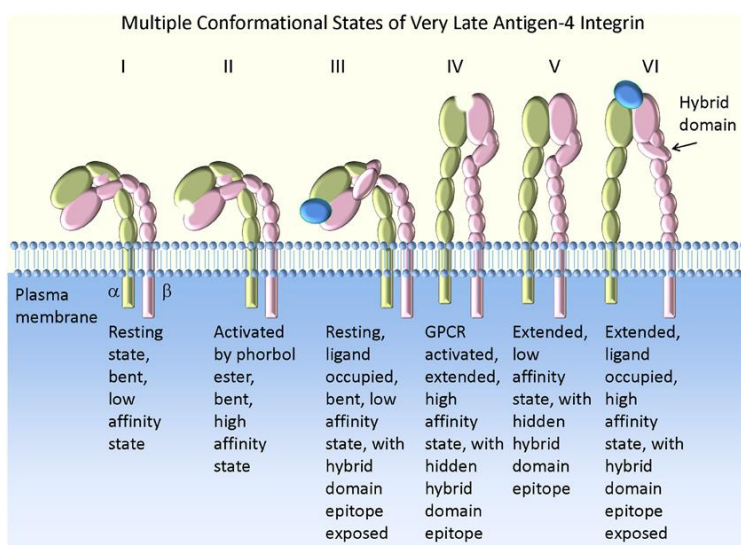


Figure 72 : Conformations multiples de VLA-4 (Chigaev et Sklar., 2012).

VCAM-1 fait partie des molécules d'adhésion cellulaire permettant l'adhésion ferme de certains leucocytes à la surface de l'endothélium vasculaire. Cette interaction cellule à cellule est médiée entre VCAM-1 et ses ligands naturels, que sont les intégrines $\alpha_4\beta_1$, appelées également

VLA-4 (very late antigen-4) (Elites et al., 1990), $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_9\beta_1$ et $\alpha_D\beta_2$. Plus spécifiquement, l'interaction entre VCAM-1 et VLA-4 est médiée par la liaison avec le domaine 1 ou le domaine 4 (Chuluyan et al., 1995). VLA-4 est une intégrine exprimée à la surface membranaire de la plupart des leucocytes, à l'exception des neutrophiles (Chavakis, 2012). Elle peut exister sous différents états conformationnels (Figure 72), entraînant des modifications de son affinité pour ses ligands que sont VCAM-1 et la fibronectine : une conformation dite fermée (faible affinité), de bas niveau énergétique, adoptée par défaut à la surface des leucocytes circulants, et une conformation dite ouverte (haute affinité), qui peut être induite de manière exogène par certains cations (Mn^{2+})

(LENTER et al., 1993) ou de manière endogène par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Chigaev et Sklar, 2012). De par ses propriétés, VLA-4 participe grandement à l'adhésion ferme des leucocytes circulants à la paroi de l'endothélium vasculaire activé, mais joue également un rôle important dans les interactions cellules à cellules, critiques dans la réponse immunitaire et dans l'hématopoïèse (Figure 73) (Dutta et al., 2015).

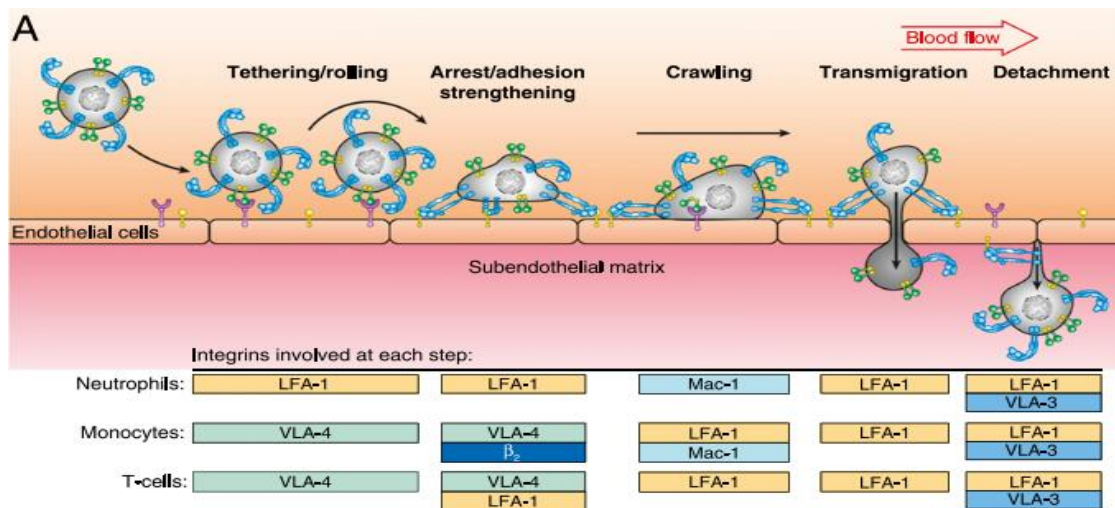


Figure 73 : Rôle des intégrines (VLA-4, LFA-1, Mac-1 et VLA-3) dans le recrutement des leucocytes (monocytes, neutrophiles et LT) (Herter et Zarbock, 2013).

V.B Nature du radiotracer : les nanobodies

Des anticorps particuliers ont été découverts pour la première fois par Hamers-Casterman et al., en 1993, chez des dromadaires. Il a en effet été observé que les camélidés et certaines espèces de poissons cartilagineux possèdent en plus d'anticorps conventionnels, des anticorps (IgG2 et IgG3) dépourvus de chaînes légères appelés HCABs (Heavy Chain Antibodies) et Ig-NAR respectivement. Les nanobodies que l'on appelle également V_{H_H} (Variable domain of a Heavy chain) ou sdAbs (single-domain antibody-fragments), correspondent au fragment variable de l'unique chaîne lourde de ces anticorps HCABs ou Ig-NAR. De plus, ces nanobodies n'ont pas de domaine constant CH1 au niveau de leur chaîne lourde, permettant normalement leur liaison avec la chaîne légère par un pont disulfure (Muyldermans et al., 1994). Par rapport aux V_H , les V_{H_H} ont une solubilité et une stabilité plus importantes (Omidfar et al., 2007). Ils possèdent des affinités et des spécificités équivalentes aux IgG conventionnelles grâce à

leurs 3 boucles CDR (complementarity determining regions) qui interagissent avec l'antigène (Figure 74). Ces nanobodies ont été produits avec succès chez différents hôtes, tels que les levures, les bactéries et les cellules de mammifères (Harmsen et De Haard, 2007).

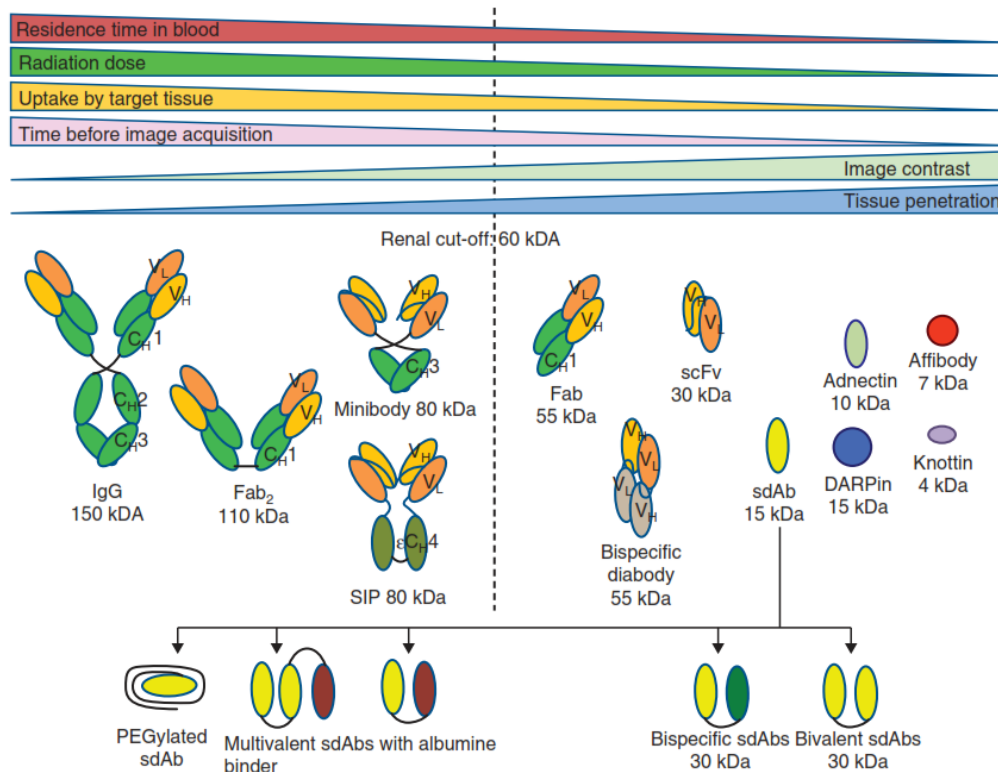


Figure 74 : Caractéristiques des différents types de traceurs utilisés en imagerie (De Vos et al., 2013).

Leur atout principal pour l'imagerie nucléaire est leur faible poids moléculaire (<15 kDa). Par conséquent, ils sont éliminés bien plus rapidement du sang que les anticorps conventionnels (150 kDa) et permettent d'avoir un rapport signal sur bruit de fond (rapport S/B) important. En revanche, ce faible poids moléculaire entraîne une réabsorption par le cortex rénal, au niveau des tubules contournés proximaux, dont le complexe de protéines mégaline/cubiline en est le principal acteur (Kozyraki et al., 2001). En effet, ces deux protéines chargées négativement vont capter les molécules chargées positivement et d'un poids moléculaire <60 kDa, pour former un complexe ligand/récepteur qui sera internalisé dans des puits à clathrine afin d'être transféré dans les endosomes. Cette rétention rénale peut être réduite par une co-injection de Gélofusine® et de lysine, ou en réduisant la présence d'acides aminés chargés négativement (Tchouate Gaïnkam et al., 2011).

La première injection à l'homme d'un nanobody radiomarqué a été réalisée en 2016 par l'équipe de Tony Lahoutte (Keyaerts et al., 2016). Cette phase I d'essai clinique avait pour objectif d'évaluer l'innocuité, la dosimétrie et la biodistribution d'un anti-HER2 marqué au ^{68}Ga , ainsi que son efficacité dans le diagnostic des tumeurs primaires et métastatiques du cancer du sein. Sa dosimétrie comparable à celle des traceurs utilisés en routine et sa captation élevée dans les tumeurs exprimant la cible ont montré tout le potentiel de cet agent d'imagerie. Une phase II est en cours et devrait s'achever en septembre 2019 (NCT03331601). Outre l'imagerie moléculaire, d'autres champs d'application ont également été investigués, notamment la thérapie en oncologie, la vectorisation des médicaments, la radiothérapie interne vectorisée (Steeland, Vandenbroucke, et Libert, 2016), mais également en biologie structurale (Pardon et al., 2014). De nombreux nanobodies (nbs) sont actuellement en phase I, II ou III comme le caplacizumab, qui est évalué chez des patients atteints du purpura thrombotique thrombocytopénique. Il est à noter qu'une faible immunogénicité a été observée dans ces différentes études, en raison d'une grande homologie de séquence des nbs avec celle du VH humain (Muyldermans, 2013).

V.C Production et sélection de nanobodies anti VCAM-1

V.C.1 Génération des nanobodies

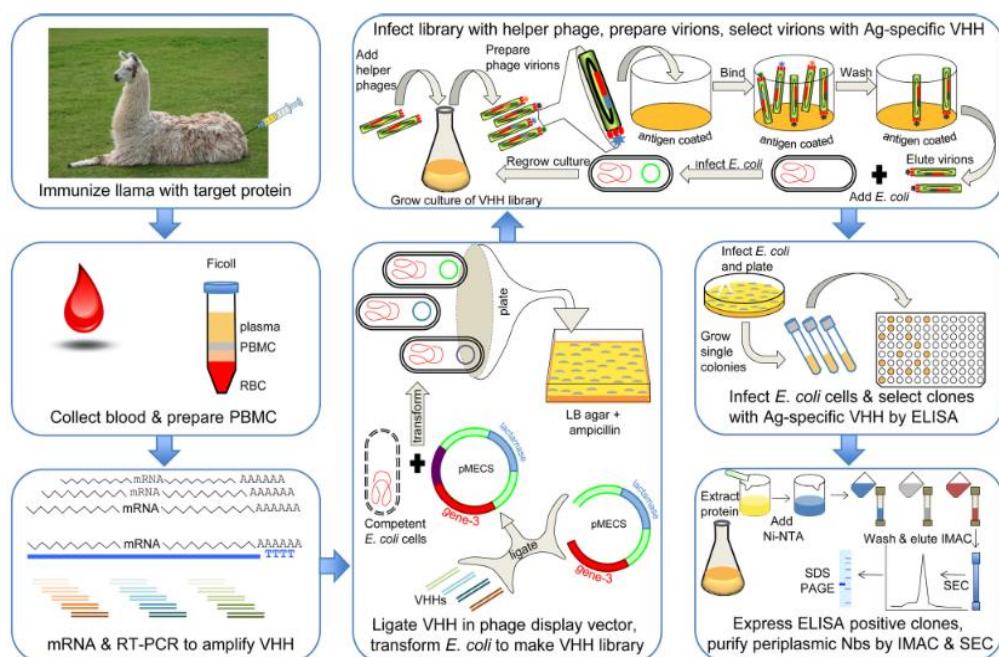


Figure 75: Représentation schématique du processus de génération d'un nanobody, partant de l'immunisation d'un camélidé (Dmitriev, Lutsenko, et Muyldermans, 2016).

Un dromadaire a été immunisé par l'injection de la protéine recombinante VCAM-1 humaine et murine. Les lymphocytes ont été isolés, l'ARNm purifié puis amplifié par RT-PCR pour être cloné dans un phage. La sélection a été réalisée par la technique dite de "phage display". Brièvement, une banque de phages-peptides est générée à partir d'un phage filamenteux M13 appelé également bactériophage, qui est un virus infectant les bactéries gram négatives et dont le gène de la protéine pIII permet de cloner la séquence codante des fragments d'anticorps d'intérêt en fusion à celle de la protéine de surface (Figure 75). Ainsi, grâce à l'expression à leur surface des nanobodies, les phages recombinants sont sélectionnés en fonction de leur capacité à se lier à leur antigène immobilisé (VCAM-1 murin/humain). Plusieurs cycles répétés de sélection sur la protéine recombinante VCAM-1 murine et humaine ont été effectués afin d'obtenir des nanobodies spécifiques et cross-réactifs pour certains d'entre eux. Enfin, les gènes codants pour ces nanobodies ont été clonés et exprimés par la bactérie *E.coli*, avec ajout d'un "tag polyhistidine" (queue composée de 6 histidines), facilitant leur purification et leur radiomarquage au ^{99m}Tc . Après séquençage, 31 nanobodies ont pu être identifiés. Un nanobody contrôle appelé cAbBcII10 a également été produit selon le même procédé, avec ajout d'un tag polyhistidine. Celui-ci cible la protéine β lactamase exprimée par certains microbes.

Les résultats obtenus au LRB par Broisat et al. présentent pour la première fois l'utilisation des nanobodies pour l'imagerie cardiovasculaire (Broisat et al., 2012).

Au final, 10 nanobodies (cAbVCAM1-1 à cAbVCAM1-10) ont été retenus et évalués *in vitro* et *in vivo* afin de déterminer le meilleur candidat pour l'imagerie des plaques d'athérome.

V.C.2 *Caractérisation in vitro*

Dans un premier temps, des analyses par cytométrie en flux ont permis de mettre en évidence parmi les 10 nanobodies testés que 6 d'entre eux étaient cross-réactifs humain/murin. Leurs affinités avant radiomarquage, déterminées par résonance plasmonique de surface (SPR), étaient comprises entre 0,2 et 45,7 nM pour la protéine recombinante murine. Trois familles d'épitopes différents parmi ces 10 nanobodies (cAbVCAM1-1/5, cAbVCAM1-2/3/6/7/9/10 et

cAbVCAM1-4/8) ont été identifiées par des études de compétitions analysées par SPR.

Comme attendu, des études par dichroïsme circulaire ont confirmé la haute thermostabilité de ces nanobodies, comprises entre 59,4°C et >87°C (Figure 76).

Radiotracer	%ID/g Lesion	Lesion: Control	Lesion: Blood	Lesion: Heart	K _D mVCAM1, nmol/L	K _D hVCAM1, nmol/L	Production Yield, mg/L	T _m , °C
cAbVCAM1-1	0.87±0.08 #9	2.15±0.20 #9	0.74±0.10* #10	2.65±0.23* #9	8.3±1.2 #7	12.4±0.5 #5	2.0 #7	72.3±0.1 #2
cAbVCAM1-2	2.15±0.29* #6	2.90±0.45 #6	3.37±0.32* #5	5.55±0.58* #7	0.3±0.0 #2	Not cross-reactive	5.0 #5	62.3±0.1 #6
cAbVCAM1-3	2.95±0.16* #2	4.07±0.56 #3	5.06±0.39* #1	7.40±0.91* #3	2.4±0.1 #5	9.1±0.9 #4	6.8 #3	59.7±0.1 #9
cAbVCAM1-4	2.21±0.59* #5	3.20±0.74 #5	1.41±0.29 #9	1.96±0.56* #10	0.2±0.0 #1	Not cross-reactive	6.8 #3	59.4±0.1 #10
cAbVCAM1-5	2.53±0.08* #3	4.95±0.85* #1	4.32±0.48* #2	8.30±1.11* #1	2.0±0.0 #4	6.5±0.7 #3	10.5 #1	>87 #1
cAbVCAM1-6	0.73±0.08 #10	4.57±0.93* #2	1.85±0.37 #8	4.98±0.75 #8	5.2±0.6 #6	Not cross-reactive	3.0 #6	72.0±0.1 #3
cAbVCAM1-7	1.27±0.25* #8	2.88±0.65 #7	4.02±1.05* #3	5.98±0.96 #4	26.6±1.2 #9	Not cross-reactive	6.9 #2	60.9±0.3 #8
cAbVCAM1-8	2.48±0.46* #4	1.40±0.10 #10	3.66±0.10* #4	7.71±0.38* #2	13.2±0.3 #8	1.4±0.5 #1	1.5 #8	61.5±0.1 #7
cAbVCAM1-9	2.99±0.07* #1	2.19±0.60 #8	2.51±0.03* #6	5.69±0.36* #6	0.9±0.2 #3	5.3±0.7 #2	0.9 #9	66.8±0.2 #4
cAbVCAM1-10	1.93±0.14* #7	3.47±0.67* #4	2.01±0.14* #7	5.76±0.56* #5	45.7±20.0 #10	18.4±7.0 #6	0.8 #10	63.4±0.2 #5
cAbBcII10	0.68±0.06	1.66±0.28	1.57±0.09	4.00±0.14	ND	ND	5.0	77.5±0.2

Figure 76 : Comparaison des 10 nanobodies sélectionnés en fonction de leur rapport signal/bruit, de leur affinité pour VCAM-1 recombinant humain et murin, de leur rendement de production et de leur thermostabilité (Broisat et al., 2012).

V.C.3 Radiomarquage

Après radiomarquage au ^{99m}Tc par la méthode du tricarbonyle, la pureté radiochimique était >95% pour tous les nanobodies évalués, et ce marquage n'a pas engendré d'altération de la reconnaissance à la cible, excepté pour cAbVCAM1-8 (Broisat et al., 2012).

V.C.4 Evaluation in vivo

Ces nanobodies radiomarqués ont été évalués sur deux modèles murins.

Souris C57Bl/6j

Une fixation plus importante des nanobodies ciblant VCAM-1 a été observée dans les organes lymphoïdes (thymus, rate et moelle osseuse), qui expriment de manière constitutive cette cible, comparée à celle du nanobody contrôle (cAbBcII10). Comme attendu, ces nanobodies sont éliminés majoritairement par la voie rénale, avec une activité mesurée au compteur gamma allant de 97 à 315% DI/g. Dans tous les autres tissus prélevés, la fixation des nanobodies a été inférieure à 2% DI/g.

Souris athéromateuses ApoE^{-/-}

Ce modèle animal de délétion de l'Apolipoprotéine E présente l'avantage de développer spontanément des plaques d'athérome (Nakashima et al., 1994). Afin d'accélérer la formation des lésions, les souris ont été mises sous un régime hypercholestérolémiant, appelé "western diet", contenant entre autres 0,25% de cholestérol. Pour la plupart des nanobodies testés, la fixation a été >2% DI/g au sein des lésions athéromateuses en comparaison des 0,68% DI/g observés pour le nanobody contrôle.

V.C.5 Sélection du meilleur candidat : cAbVCAM1-5

Après l'évaluation des différents paramètres cités précédemment (affinité, stabilité thermique, rendement de production, biodistribution) pour les 10 nanobodies, cAbVCAM1-5 s'est avéré être le meilleur candidat. En effet, en plus de sa haute spécificité et sa cross-réactivité humain/murin, ce nanobody a présenté la plus haute fixation au sein des plaques d'athérome ainsi que les meilleurs rapports lésion/sang, lésion/cœur et lésion/artère saine.

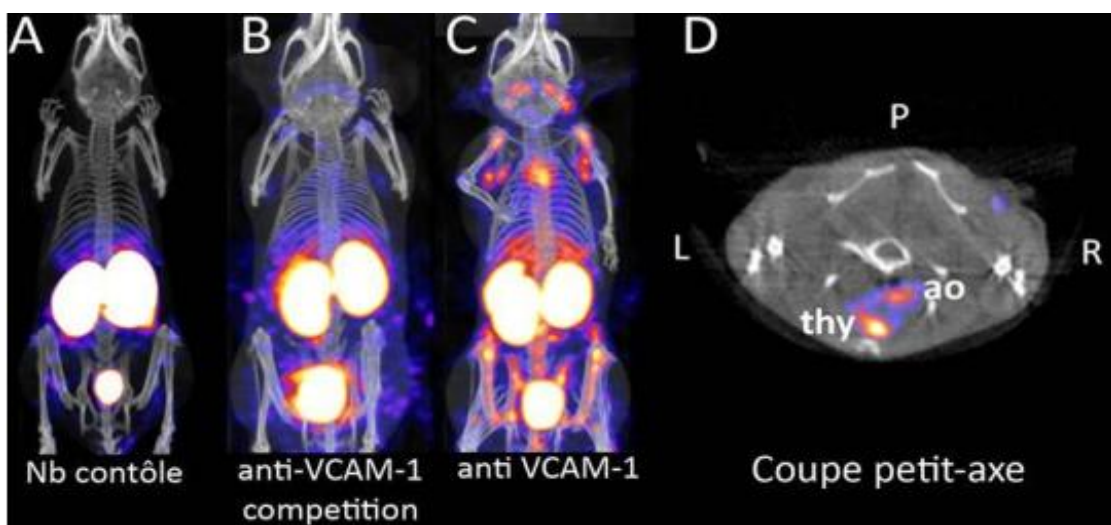


Figure 77 : Image SPECT/CT obtenues 2h après l'injection du nanobody contrôle (A), de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 en présence (B) ou non (C) d'un excès d'un nanobody non radiomarqué chez des souris ApoE^{-/-}. (D) Image SPECT/CT d'une coupe transversale présentant la fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 dans les lésions athéromateuses au niveau de l'aorte ascendante de souris ApoE^{-/-}. Ao=Aorte ; thy=Thymus (Broisat et al., 2012).

Des études supplémentaires ont été menées afin d'évaluer *in vivo* sa spécificité de fixation. Lorsque celui-ci a été co-injecté avec un compétiteur froid chez des souris ApoE^{-/-}, une diminution de la fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 a été observée sur les images SPECT/CT (Figure 77-B et C) et en biodistribution par prélèvement d'organes dans les tissus VCAM-1 positifs tels que la rate, la moelle

osseuse, le thymus, les ganglions lymphatiques et les lésions athéromateuses. De plus, les lésions athéromateuses étaient clairement visibles sur les images SPECT/CT lorsque ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 a été injecté seul (Figure 77-D).

Dans cette étude, la preuve de concept de l'imagerie de la plaque d'athérome à l'aide d'un nanobody chez un modèle de souris ApoE^{-/-} a été démontrée avec succès. Son affinité de l'ordre du nanomolaire, sa clairance rapide, sa spécificité de fixation et sa cross-réactivité font de celui-ci, un agent d'imagerie à fort potentiel pour les problématiques cliniques actuelles, notamment pour le diagnostic non invasif des plaques d'athérome vulnérables.

C'est dans cette perspective et suite à ces très bons résultats précliniques que le projet "Molecular imaging of Coronary lesions in Clinical practice" (MC²) est né, avec pour objectif de transférer vers la clinique ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5. Ce projet a été sélectionné lors d'un appel à projet transversal (Programme de Recherche transversale en Santé - PRTS) permettant ainsi de financer les étapes indispensables à son transfert en clinique (production aux normes des bonnes pratiques de fabrication, caractérisation des lots, étude de toxicité).

VI TRANSFERT CLINIQUE

Pas moins de 9 à 12 ans sont nécessaires avant qu'un nouveau médicament ne soit disponible à l'homme. Cette longue période de développement est primordiale dans le but prouver son efficacité et son innocuité. Ce processus peut être résumé en 5 étapes :

- Phase de recherche (pathologie, cible)
- Les études précliniques et pharmacologiques
- L'étude toxicologique
- Les études cliniques
- L'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM)

VI.A.1 *Le médicament radiopharmaceutique (MRP)*

Un MRP est un médicament contenant un isotope radioactif, appelé radionucléide, destiné à être administré au patient dans un but diagnostique ou

thérapeutique. Il peut être utilisé seul (Thalium 201,...) ou bien lié à des vecteurs (anticorps, cellules sanguines, particules, ...). Selon le code de la santé publique (L.5111-1), un médicament est défini comme "toute substance ou composition présentée possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, **en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer , corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques** en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique". La première autorisation de mise sur le marché (AMM) des MRP date de 1978, et ils sont rentrés dans le domaine du médicament en 1989 en Europe et transposés en 1992 en France (Directive de l'Union Européenne n°1989, 3 mai). Ils sont donc soumis à une double réglementation :

- celle du médicament (l'agence nationale de sécurité du médicament [ANSM], l'agence régionale de santé [ARS], ...)
- celle des radioéléments (l'institut de radioprotection et de sûreté nucléaire [IRSN] et l'autorité de sûreté du nucléaire [ASN])

VI.A.2 *Aspect réglementaire du MRP*

De par ce double référentiel législatif, tout radiopharmaceutique destiné à être injecté à l'homme nécessite donc de suivre un parcours réglementaire stricte et rigoureux. Un MRP ne peut obtenir d'AMM que si celui-ci est produit par une entreprise titulaire d'une autorisation de fabrication, régulièrement contrôlée par les organismes compétents. Cette autorisation d'AMM garantit que "tous les médicaments ont été évalués par les autorités compétentes et ce, afin de s'assurer de leur conformité aux exigences actuelles de sécurité, de qualité et d'efficacité". La Commission Européenne a établi les principes et lignes directrices des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) pour les médicaments à usage humain (directive 2003/94/CE) qui s'appliquent à la fois à la fabrication et au contrôle de la qualité. Les principales exigences des BPF sont les suivantes (guide BPF, ANSM 2017) :

- Tous les procédés de fabrication sont clairement définis, systématiquement revus à la lumière de l'expérience et montrent qu'ils

sont capables de produire de façon répétée des médicaments de la qualité requise et conforme à leurs spécifications ;

- Les étapes critiques de la fabrication et toutes les modifications importantes sont validées ;
- Tous les moyens nécessaires à la mise en œuvre des BPF sont fournis, y compris le personnel qualifié, le matériel et les services adéquats.
- Des relevés sont établis manuellement et/ou avec des appareils d'enregistrement, pendant la fabrication.
- Toutes les déviations significatives sont enregistrées de façon détaillées et examinées dans le but d'en déterminer la cause et de mettre en œuvre des actions correctives et préventives appropriées.

VI.A.3 *Développement d'un MRP*

VI.A.3.1 Phase de recherche :

Avant toute chose, tout projet visant à développer un médicament doit répondre à une problématique clinique. Bien identifier les besoins des cliniciens est nécessaire dans la conception de molécules à visée diagnostique et/ou thérapeutique afin de trouver la cible moléculaire la plus spécifique du processus pathologique ciblé.

Plus particulièrement pour les MRP, le choix du vecteur est primordial et peut-être de nature différente (molécule organique, peptides, anticorps, nanoparticules, ...). Enfin le choix du radioélément est également important puisqu'il peut modifier la biodistribution de la molécule et ne sera pas le même en fonction de son utilisation, diagnostique (émetteurs γ et β^+) ou thérapeutique (émetteurs β^- et α).

VI.A.3.1.1 *La recherche préclinique :*

VI.A.3.1.1.1 *Etude pharmacocinétique*

Elle permet d'évaluer *in vitro* et *in vivo* (chez l'animal) l'intérêt biologique du vecteur seul, puis radiomarké. Les modèles animaux utilisés sont le plus souvent des rongeurs (rat, souris) mais on peut également évaluer ces molécules chez le chien, le porc ou le primate (plus rare). Ces études permettent l'évaluation spatiale et temporelle de la biodistribution du radiotracer. Elles

permettent également de déterminer sa voie d'élimination (hépatique, rénale). Au cours du développement préclinique, de nombreuses études de pharmacologie (efficacité) et de pharmacocinétique (décrire le comportement de la molécule) sont réalisées afin de qualifier la molécule.

VI.A.3.1.1.2 *Evaluation de l'innocuité au stade préclinique :*

Les études toxicologiques visent à établir un profil toxicologique d'une substance (organes cibles, dépendance à la dose, relation avec l'exposition) et de déterminer des doses seuils en vue d'une injection à l'homme. Ces informations permettent d'estimer la dose initiale et la dose maximale qui seront utilisées pour l'essai clinique. Elles concernent l'étude des effets indésirables d'une substance sur les fonctions physiologiques (système cardiovasculaire, nerveux et respiratoire) et doivent être réalisées obligatoirement selon les BPL.

Les études non cliniques visant à évaluer les effets indésirables d'une molécule ont été définis et harmonisés au niveau international par la Conférence Internationale sur l'harmonisation (ICH) (M3) regroupant les Etats-Unis, l'Europe et le Japon. Dans le module 3 (M3) sont énoncées toutes les exigences qui doivent être satisfaites dans les études d'innocuité non cliniques avant de débiter un essai clinique. Diverses approches existent en fonction de la nature de la molécule et de l'essai clinique.

- Administration unique : La toxicité aiguë vise à déterminer les doses toxiques maximales chez l'animal et la dose sans effet nocif observé (NOEL). Elle doit être effectuée chez au moins 2 espèces de mammifères (rat, souris), avec 2 voies d'administration différentes et un suivi de l'ordre de 14 jours. Elle permet de déterminer la dose létale 50 (DL50), qui correspond à la dose pour laquelle 50% des animaux sont morts, la dose maximale tolérée et la dose maximale sans effet toxique. Ce type d'études était réalisé de manière systématique avant toute injection à l'homme d'un nouveau médicament radiopharmaceutique. De nos jours, il existe des méthodes alternatives, plus rapides et moins coûteuses telles que l'"extended single dose toxicity" (micro-dose).
- Administration répétée : La toxicité chronique permet d'obtenir des renseignements quant à l'accumulation de la substance dans les tissus spécifiques et ses possibles modifications fonctionnelles suite à des

injections répétées. Elle est également réalisée chez au moins 2 espèces de mammifères dont une non- rongeur. La durée recommandée de l'étude dépend essentiellement de la durée des essais cliniques futurs. Ces études ne concernent pas les MRP car ils sont généralement injectés qu'une seule fois.

- Reprotoxicité : L'objectif de ces études est de rendre compte des potentiels effets de la molécule sur la fertilité et la gestation. (ICH S5A: Detection of toxicity to reproduction for medicinal products). Sachant que les MRP ne peuvent pas être administrés aux femmes enceintes, ce test ne s'applique pas aux MRP.
- Génotoxicité : Cette étude a pour but d'évaluer de possibles effets mutagènes et/ou clastogènes. Dans la majorité des cas, un test de mutation génique (test d'Ames) est suffisant. Il est réalisé *in vitro* sur des souches de *Salmonella Typhimurium*. Un deuxième test est effectué dans le cas d'un essai où l'administration est répétée. Il s'agit d'un test d'aberration chromosomique *in vitro* sur cellules de mammifères. Un troisième test peut être requis en cas de résultats non concluants et consiste à réaliser un test d'aberration chromosomique *in vivo* sur cellules hématopoïétiques de rongeur (rat, souris).
- Carcinogénicité : Cette étape permet de détecter d'éventuels effets carcinogènes. Elle consiste à administrer au long cours (2 ans, ou plus) la molécule chez 2 espèces différentes (rat, souris) avec 3 niveaux de doses. Cette étude est généralement accomplie en parallèle des premières administrations chez l'homme. Concernant les MRP, les possibles effets carcinogènes dus à l'exposition des patients à des radiations sont déjà pris en compte par l'évaluation de la dosimétrie.

VI.A.3.1.1.2.a Spécificité pour les médicaments expérimentaux administrés en micro-dose

La micro-dose est définie selon l'agence européenne du médicament (EMA) comme étant une dose inférieure au 1/100^{ème} de la NOEL ("no observed effect level") et de la dose calculée pour avoir un effet pharmacologique.

Elles concernent toutes molécules injectées chez l'homme à des doses $\leq 100 \mu\text{g}$ et s'appliquent à la majorité des MRP. Deux protocoles peuvent être utilisés afin d'évaluer la toxicité pour les micro-doses :

- "Extended single dose toxicity" (CPMP/ICH/286/95) : qui consiste à injecter à des rongeurs une dose 100 à 1000 fois supérieure à la dose maximale prévue chez l'homme et à sacrifier les animaux à 2 et 15 jours après son administration. Un groupe contrôle et un groupe traité sont nécessaires avec un nombre suffisant d'animaux dans chaque groupe afin d'observer de possibles manifestations toxiques. Ces analyses ont pour objectif d'obtenir des données hématologiques (hémogramme...) et chimique du sang (ionogramme, glycémie, lipidique...) ainsi que des données histopathologiques après nécropsie des animaux qui incluent une évaluation approfondie du contenu des cavités thoraciques et abdominales, du crâne, de tous les orifices, de la surface externe du corps, à J2 et J15 et dans l'éventualité de mort dû à molécule, des possibles causes de décès.
- Le deuxième protocole est réalisé avec des doses répétées pendant 7 jours avec un nombre maximal d'injections inférieur ou égal à 5 injections, une dose maximale de 100 µg/injection et une dose cumulée maximale de 500 µg.

Une des limitations de cette approche, notamment pour les molécules à haut poids moléculaire, consiste à ne prendre en compte que la quantité massique de la molécule, alors que les effets toxiques et pharmacologiques sont déterminés par la quantité molaire. Les dernières recommandations suggèrent donc que la concentration molaire à injecter à l'homme ne doit pas dépasser les 30 nM pour être considéré comme micro-dose (Koziorowski et al., 2017).

VI.A.3.2 Dossier du médicament expérimental (DME)

Le développement et l'autorisation de mise sur le marché de MRP sont régulés par la directive 2001/83/EC relatives aux médicaments à usage humain. L'essai clinique est soumis à autorisation délivrée par l'ANSM, après soumission du dossier du médicament expérimental (DME). Le DME comprend 3 parties regroupant toutes les données disponibles sur le MRP :

- Partie 1 : qualité pharmaceutique, chimique ou biologique de la substance active et du produit fini.
- Partie 2 : données non cliniques obtenues à partir des études pharmacologiques et de toxicité.

- Partie 3 : données cliniques.

VI.A.3.3 Les essais cliniques

Un essai clinique est une recherche biomédicale organisée et pratiquée sur l'homme en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales. Ils peuvent être divisés en 2 groupes, selon leur objectif :

- Tester un nouveau médicament (Recherche clinique industrielle) ;
- Comparer des stratégies ou des techniques diagnostiques existantes afin de les optimiser ou de les harmoniser (Recherche clinique Institutionnelle).

Les essais cliniques sont menés pour établir ou vérifier certaines données pharmacocinétiques (distribution, absorption, métabolisme et excrétion d'un médicament), pharmacodynamiques (mécanismes d'action d'un médicament), et thérapeutiques (efficacité et tolérance) d'un nouveau médicament ou d'une nouvelle façon d'utiliser un traitement. Un avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP) et une autorisation de l'ANSM sont nécessaires afin de débiter un essai clinique. Ils commencent généralement par une exposition de volontaires sains à des doses faibles et se poursuivent chez les volontaires malades. Les essais cliniques sont donc une étape indispensable en vue d'une AMM.

La réglementation sur les essais cliniques a évolué depuis ces dernières années. La directive 2001/20/EC a été abrogée et remplacée par un règlement de la commission et du parlement Européen en 2014 (536/2014) qui apporte des modifications importantes, notamment concernant les MRP (articles 61, 63, 66 et 67). En résumé, de nombreux assouplissements réglementaires ont été effectués concernant la fabrication, la préparation et les règles d'étiquetage des médicaments radiopharmaceutiques à visée diagnostique. Cette directive a pris effet en mai 2016.

Ces essais cliniques sont composés de 5 phases (Figure 78) :

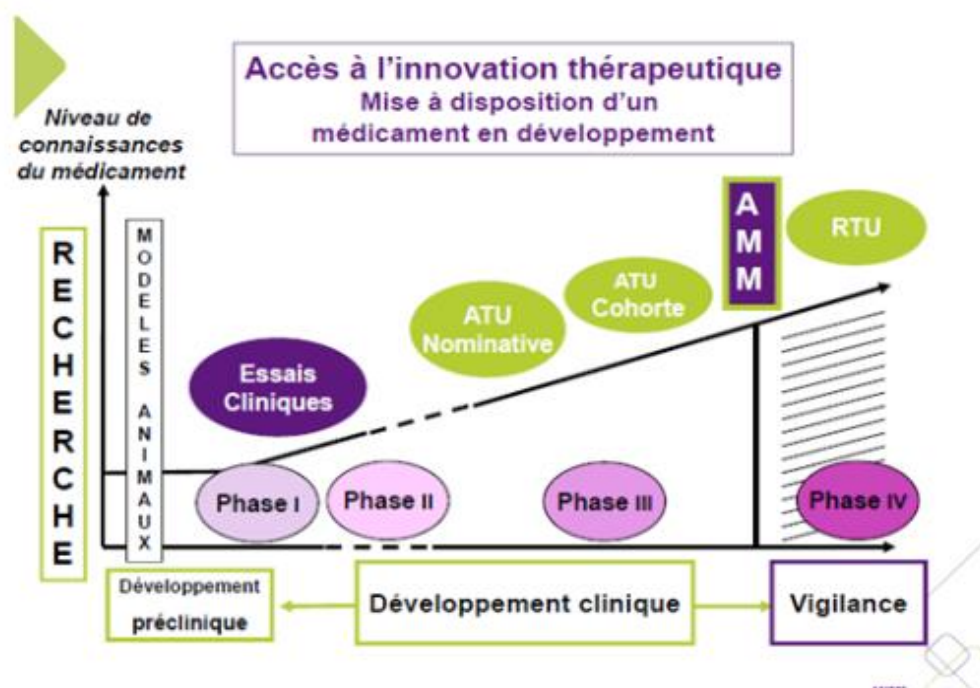


Figure 78 : Les différentes phases des essais cliniques.

Phase 0 exploratoire :

Cette phase vise à répondre précocement à des questions très précises permettant de décider de la poursuite ou non du développement du médicament. L'objectif n'est donc pas d'évaluer la dose maximale tolérée, ni l'efficacité. Ces essais comprennent un nombre de patients ou de sujets sains limités, à des doses réduites et pendant une courte exposition.

Phase I : Les études cliniques de phase I s'attachent à évaluer l'innocuité et la dosimétrie d'une molécule chez des volontaires sains afin d'établir un profil pharmacocinétique/pharmacodynamique. Ces essais ont lieu dans des centres spécialisés ayant reçu l'agrément des autorités de santé. Ils sont généralement réalisés sur un nombre assez restreint de volontaires sains (une dizaine). Chaque volontaire ne reçoit qu'une seule dose du médicament.

Phase II : Les essais cliniques de phase II ont pour objectif de déterminer la posologie optimale d'un médicament en termes d'efficacité et de tolérance sur une population composée de volontaires malades (quelques dizaines pour un MRP). Ils sont divisés en deux phases. La phase IIa permet d'étudier les propriétés pharmacodynamiques déjà évaluées chez l'animal. La phase IIb a

pour objectif de déterminer la posologie optimale du médicament en termes d'efficacité et de tolérance.

Phase III : Les essais sont réalisés sur plusieurs centaines de patients. Cette phase permet d'évaluer le rapport bénéfice/risque de la molécule et ainsi de conclure sur son efficacité thérapeutique. A l'issue de cette phase, les résultats sont soumis à l'ANSM et à l'EMA pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché (AMM). Ces autorisations visent à s'assurer de la sécurité des personnes.

Phase IV : Les essais cliniques de phase IV sont également appelés études de surveillance. Elles sont effectuées après la commercialisation du médicament afin d'approfondir les connaissances de celui-ci dans la pratique courante et de détecter les potentiels effets indésirables rares.

Partie Expérimentale

PARTIE EXPERIMENTALE

I INTRODUCTION

L'objectif de ma thèse a été double :

I/ Poursuivre le développement préclinique de cAbVCAM1-5

II/ Transférer cAbVCAM1-5 vers la clinique

Partie 1

Dans l'objectif de finaliser le développement préclinique de cAbVCAM1-5 et de valider son potentiel dans l'évaluation de nouvelles thérapeutiques, les études conduites dans le cadre de ma thèse ont eu pour but de :

- Poursuivre la caractérisation préclinique de cAbVCAM1-5 chez la souris, en évaluant sa sensibilité par l'utilisation de thérapeutiques connues, telles que les Statines et l'Ezétimibe.
- Evaluer le potentiel thérapeutique anti-athérogène de nouvelles thérapies inhibitrices du récepteur à l'ADP, P2Y₁₂.
- Caractériser la fixation macroscopique et microscopique de cAbVCAM1-5 par imagerie optique.
- Evaluer les effets possibles de la fixation de cAbVCAM1-5 sur l'interaction entre VCAM-1 et son ligand naturel VLA-4.

Partie II :

Dans le but de transférer cAbVCAM1-5 vers la clinique, mes travaux de recherche ont porté sur :

- La caractérisation des lots produits selon les bonnes pratiques de fabrication (BPF).
- La validation biologique de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5, obtenu à l'issue de l'optimisation de la méthode de radiomarquage.

II PARTIE I : CARACTERISATION PRECLINIQUE DE ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5

II.A Evaluation de la sensibilité de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 pour l'imagerie de l'inflammation des plaques d'athérome chez la souris ApoE^{-/-}

II.A.1 *Objectif*

L'objectif de la présente étude a été d'évaluer la sensibilité de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 pour l'imagerie de l'expression de VCAM-1 au sein de lésions athéromateuses.

Une haute sensibilité est une caractéristique primordiale pour l'imagerie des plaques vulnérables et pour l'évaluation de l'efficacité de nouvelles thérapies anti-athérogènes. Le rôle de l'inflammation dans le développement de l'athérosclérose est central et a été confirmé dans une récente étude clinique (CANTOS) (Ridker et al., 2017). Ces avancées ont ouvert la voie au développement de nouvelles thérapies anti-inflammatoires de la maladie coronaire. Par conséquent, un agent d'imagerie spécifique et sensible du processus inflammatoire représenterait un outil idéal pour l'évaluation de cette nouvelle génération de thérapies.

Les statines sont des médicaments de première intention prescrites en prévention primaire ou secondaire dans le traitement des hyperlipidémies et de la maladie coronaire (Cf revue bibliographique chapitre III.A.1.1, page 94). Parmi ces statines, l'atorvastatine a été précédemment utilisée dans le but d'évaluer la sensibilité de nouveaux agents d'imagerie (Nahrendorf et al., 2009).

Dans cette étude préclinique, l'atorvastatine a été utilisée chez des souris ApoE^{-/-} sous régime Western afin d'évaluer la sensibilité de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 pour le suivi de l'efficacité de thérapies anti-athérogènes.

II.A.2 *Matériels et méthodes*

II.A.2.1 Modèle animal

Toutes les procédures expérimentales ont été acceptées par le comité d'éthique de l'Université Grenoble Alpes et le ministère de la recherche.

Douze souris femelles (n=12) ApoE^{-/-} sous régime Western ont été utilisées dans le but de comparer la fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 à l'expression de VCAM-1.

Des souris femelles (n=18) ApoE^{-/-} ont été utilisées pour évaluer par un suivi longitudinal, la sensibilité de ^{99m}Tc-AbVCAM1-5 lors d'un traitement anti-athérogène. A l'âge de 16 semaines, les souris ont été nourries soit avec un régime Western (0,15% de cholestérol) (Groupe Contrôle, n=9), soit avec un régime Western contenant de l'atorvastatine 0,01% (Groupe Statine, n=9). La prise alimentaire (sous régime Western pendant 20 semaines) et la masse corporelle des animaux ont été mesurées 2 fois/semaine et 1 fois/semaine respectivement. Des prélèvements sanguins ont été effectués immédiatement avant l'initiation du régime, et avant chaque imagerie SPECT/CT (temps intermédiaire et temps final). Le sang a été centrifugé et 20 µl de plasma ont été prélevés au temps basal et au temps final. Les échantillons ont été congelés pour réaliser ultérieurement un dosage des lipoprotéines (Biomérieux) afin d'évaluer l'efficacité du traitement.

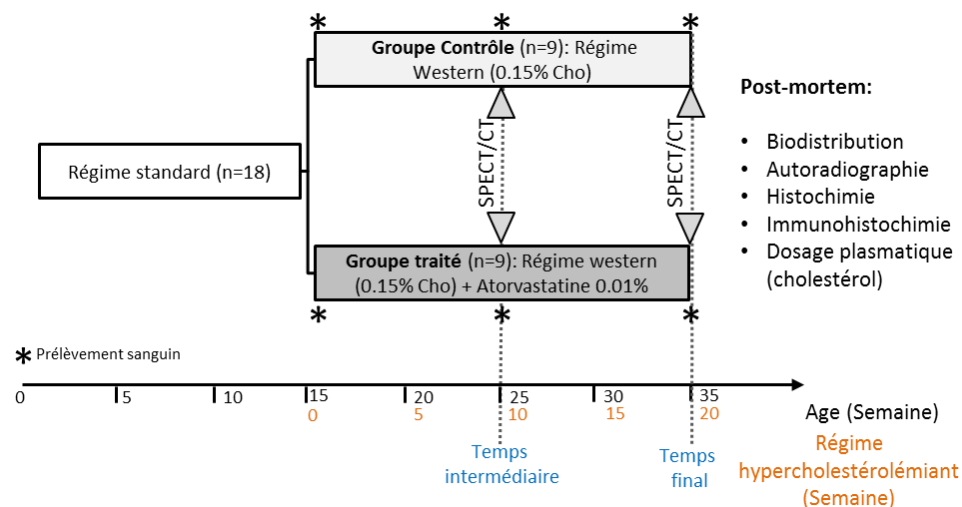


Figure 79 : Schéma du protocole expérimental.

L'imagerie SPECT/CT a été réalisée au temps intermédiaire (10 semaines de régime), puis au temps final, (20 semaines de régime). A l'issue de la seconde acquisition SPECT/CT, les animaux ont été euthanasiés par inhalation de CO₂. Le protocole expérimental est résumé dans la Figure 79.

II.A.2.2 Radiomarquage de cAbVCAM1-5 au ^{99m}Tc

Le nanobody cAbVCAM1-5 a été radiomarqué au technétium-99m en utilisant la méthode tricarbonyle décrite dans le "matériels et méthodes" de la partie expérimentale II, radiomarquage conditions standards (Cf chapitre III.B.1.1, page 223).

II.A.2.3 Comparaison entre la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 et le niveau d'expression de VCAM-1

La fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 sur des lésions athéromateuses a été comparée à l'expression de VCAM-1 chez 12 souris ApoE^{-/-} sous régime Western.

Trois heures après l'injection intraveineuse de 37 ± 3 MBq de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5, les souris ont été euthanasiées. La crosse aortique a été nettoyée sous une loupe binoculaire dans une solution contenant 10% de formaline, puis placée dans du gel à congélation (Optimal Cutting Temperature ou OCT) et refroidie dans l'isopentane à -40°C . Des séries de coupes adjacentes de $40 \mu\text{m}$ et $8 \mu\text{m}$ d'épaisseur ont été obtenues à l'aide d'un cryotome (HM 505, Microm) pour évaluer la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 par autoradiographie et pour déterminer l'expression de VCAM-1 par immunohistochimie, respectivement. Des coupes grand axe de la crosse aortique ont été réalisées permettant d'examiner simultanément plusieurs lésions athéromateuses, localisées à la fois dans l'aorte ascendante, la courbure de la crosse aortique, l'artère brachiocéphalique, la carotide commune gauche, l'artère subclavière gauche et l'aorte descendante.

II.A.2.3.1 Autoradiographie

L'autoradiographie a été réalisée en exposant pendant une nuit les coupes ($40 \mu\text{m}$) sur un film autoradiographique (BAS-TR 2025, Fujifilm), puis la révélation a été effectuée à l'aide d'un phospho-imager (BAS 5000 ; Fujifilm). Des colorations trichromatiques standard hématoxyline-éosine-safran (HES) ont ensuite été réalisées, digitalisées puis co-enregistrées avec les images autoradiographiques en utilisant les logiciels GIMP2 et ImageJ. Des régions d'intérêt ont été placées sur des lésions athéromateuses déterminées sur les colorations HES. Des tissus de référence (foie, muscle et cœur) dont l'activité a été déterminée par comptage gamma, ont été utilisés afin d'exprimer les résultats en % de la dose

injectée captée par gramme de tissu (% DI/g). Les résultats ont été corrigés du bruit de fond et de la décroissance radioactive.

II.A.2.3.2 Immunohistochimie

Le marquage immunohistochimique de VCAM-1 a été effectué sur les coupes adjacentes (8 μm) à celles utilisées pour réaliser les autoradiographies. Brièvement, après fixation des lames dans de l'acétone à -20°C pendant 5 min, le blocage des peroxydases endogènes a été réalisé par l'incubation des lames dans une solution de H_2O_2 à 0,45% durant 15 min à 20°C . Puis, une étape de blocage a permis de saturer les sites de fixation non spécifiques, par l'application durant 1h à 20°C sur les lames d'une solution contenant un mélange de gélatine de poisson (FSG) à 0,5%, de sérum d'âne à 10% et d'une solution de blocage fourni dans le kit de blocage (Vector labs). L'anticorps primaire (sc-1504, Santa Cruz Biotechnology) a été incubé sur la nuit à 4°C , puis un anticorps secondaire biotinylé produit chez l'âne a été appliqué à une concentration de 4,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (dilué dans du PBS/FSG) durant 1h à température ambiante (TA). Un système d'amplification (vectastain, ABC kit) contenant une solution composée d'avidine et de biotine conjuguée à la peroxydase a été incubée durant 30 min à TA. Le marquage a été révélé par l'application d'un chromogène, le 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Vector) sur les lames durant 5 min. En fin de protocole, une contre coloration à l'hématoxyline a été effectuée afin de mettre en évidence les noyaux.

Un score d'expression (1 à 3) de VCAM-1 a été déterminé en fonction du niveau d'intensité du marquage (faible, moyen ou élevé) par un expérimentateur entraîné, sans connaissance préalable des quantifications autoradiographiques. L'analyse a été effectuée en duplicat par le même observateur afin d'évaluer la reproductibilité intra-individu de la méthode.

II.A.2.4 Evaluation non invasive de la sensibilité de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -cAbVCAM1-5

Des souris femelles (n=18) ApoE^{-/-} sous régime Western traitées (n=9) ou non (n=9) avec de l'atorvastatine ont été utilisées.

II.A.2.4.1 Imagerie SPECT/CT

$^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ (55 ± 5 MBq) a été administré dans une veine latérale de la queue d'animaux vigiles. Deux heures après l'injection, l'animal a été anesthésié à l'isoflurane (1,5-2% dans un mélange air/oxygène 1:1) et l'imagerie SPECT/CT a été réalisée (nanoSPECT, Bioscan) en utilisant les paramètres suivants :

- SPECT : La caméra, dotée de 4 têtes, était équipée de collimateurs multi-pinholes (9 x 1,2mm dia). L'acquisition a été réalisée sur 1 champ de vue, avec 24 projections, pour une durée totale de 45 minutes.
- CT : une technique proposée par Yardeni et al. (Yaderni, 2011) a été utilisée pour injecter l'agent de contraste (Hexabrix®) lors de l'acquisition des images CT : un volume de 150 μl a été administré par voie rétro-orbitale, dans le sinus veineux orbital, juste avant le début du CT afin de visualiser l'aorte ascendante avec comme paramètres : 65 kvp, 500 ms/projection et 180 projections.

II.A.2.4.1.1 Analyse d'images

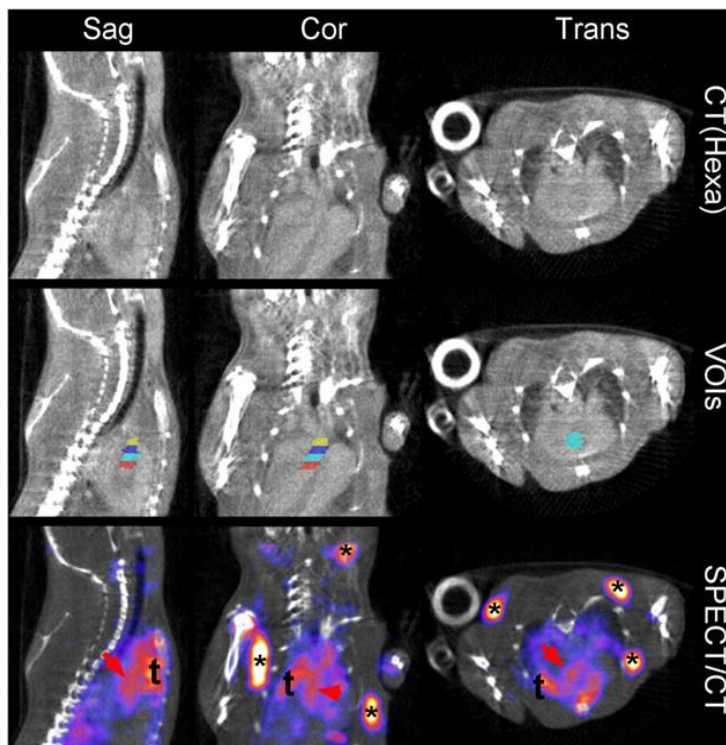


Figure 80 : Imagerie SPECT/CT. Images représentatives de vue sagittale, coronale et transversale d'images CT et SPECT/CT centrées sur l'aorte ascendante d'une souris du groupe contrôle. L'injection d'un produit de contraste a permis de délimiter de manière précise des régions d'intérêt le long de l'aorte ascendante (2^{ème} ligne). La fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ était visible sur l'image SPECT/CT au sein de l'aorte (flèche), mais également dans le thymus (t) et les ganglions lymphatiques (*). Echelle SPECT : Min = 0,3% DI/cm^3 , max 3% DI/cm^3 .

Les acquisitions SPECT et CT ont été reconstruites, fusionnées et analysées à l'aide d'un logiciel dédié (InvivoScope, Invicro). Après réorientation des images, des volumes d'intérêt (VOI) ont été positionnés en se basant sur les repères anatomiques obtenus par l'imagerie aux rayons X à l'aide du produit de contraste (Hexabrix). Quatre VOI de 2,2 mm^3 ont été dessinées le long de l'aorte ascendante, depuis les valves aortiques, afin de quantifier la captation du

radiotracteur (Figure 80). Les résultats, corrigés de la dose injectée et de la décroissance radioactive, ont été exprimés en pourcentage de la dose injectée captée par centimètre cube de tissu (% DI/cm³). Afin de s'assurer de la reproductibilité inter- et intra- observateur, les quantifications des images ont été réalisées par 3 expérimentateurs indépendants, dont les quantifications ont été reproduites 2 semaines après, par l'un d'entre eux.

II.A.2.4.2 *Analyses ex vivo*

II.A.2.4.2.1 *Biodistribution*

A l'issue de la séquence d'imagerie finale (35 semaines), 3 heures après l'injection du radiotracteur, un échantillon de sang a été prélevé par ponction intracardiaque. Les animaux anesthésiés ont ensuite été euthanasiés. L'aorte ascendante ainsi que des échantillons d'aortes saines ont été nettoyés et prélevés sous loupe binoculaire. Ces échantillons ont été rincés dans du NaCl 0,9%, pesés, puis placés dans des tubes de comptage contenant une solution de fixatif (formaline 10%). Le reste des organes et tissus d'intérêts ont ensuite été prélevés et pesés. La fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 dans chacun des échantillons prélevés a ensuite été déterminée par mesure de la radioactivité au compteur gamma (Wizard², Perkin). Les résultats ont été corrigés du bruit de fond, de la décroissance radioactive et du poids de l'échantillon, et exprimés en pourcentage de dose injectée captée par gramme de tissu (% DI/g).

II.A.2.4.2.2 *Autoradiographie (ARG)*

Après mesure de la radioactivité, le segment d'aorte composé de la valve aortique et de l'aorte ascendante a été placé dans du gel (OCT) et refroidi dans l'isopentane à -40°C. Des coupes transversales de 40 µm ont ensuite été obtenues à 6 niveaux différents de l'aorte à l'aide d'un cryotome, puis exposées en autoradiographie accompagnées de coupes de tissus de référence dont l'activité a été par ailleurs déterminée en biodistribution par comptage gamma.

Les quantifications de la fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 en autoradiographie ont été réalisées comme précédemment. Une coupe par aorte a été sélectionnée au niveau des valves aortiques. Des régions d'intérêt ont été positionnées sur les lésions athéromateuses, en se basant sur les colorations HES, la surface des

lésions a été déterminée et exprimée en μm^2 . Afin de quantifier la fixation de $^{99\text{m}}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ dans les lésions, les images HES et ARG ont été superposées. Les données ont été exprimées soit en concentration de radiotracteur fixé par unité de volume (% DI/g) soit en fixation totale de radiotracteur fixée dans l'ensemble des lésions présentes sur la coupe (% DI/coupe).

Des coupes adjacentes de 10 μm ont également été obtenues afin de réaliser ultérieurement des colorations histologiques (HES, lipides) et immunohistologiques (VCAM-1).

II.A.2.5 Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme : moyenne \pm écart-type. Les valeurs de fixation de $^{99\text{m}}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ déterminées par prélèvement d'organes ou quantification d'images SPECT ont été comparées en utilisant un test t pour valeurs appariées (intra-groupe : temps intermédiaire vs temps final) ou non appariées (inter-groupe). Un test de régression linéaire de Pearson a également été utilisé pour déterminer le coefficient de corrélation liant l'activité obtenue en biodistribution de l'aorte ascendante avec celle obtenue par imagerie SPECT. Le seuil de significativité a été fixé à 5% ($P < 0,05$).

II.A.3 Résultats

II.A.3.1 Fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 vs l'expression de VCAM-1

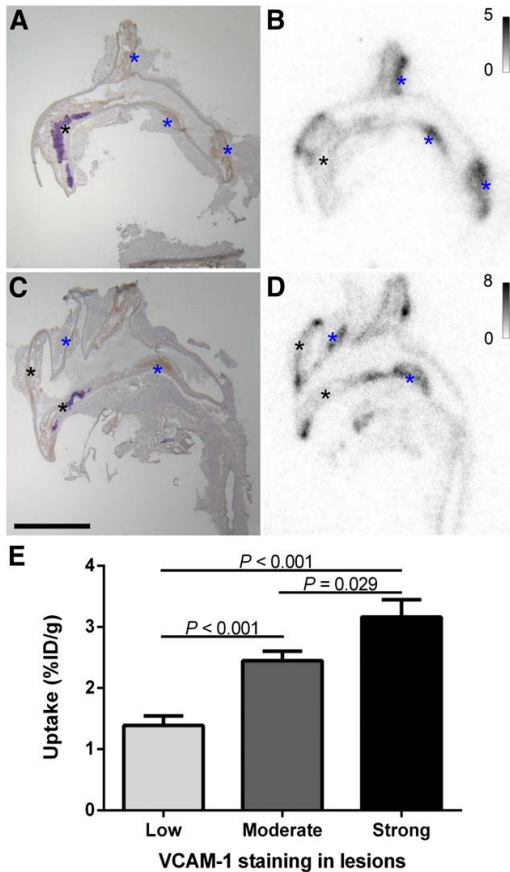


Figure 81: Fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 et expression de VCAM-1. Images représentatives d'immunohistochimie de VCAM-1 réalisées sur des coupes longitudinales de crosse aortique de souris ApoE^{-/-} (A, C). Autoradiographies de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 effectuées sur des coupes adjacentes (B, D). Relation entre l'expression de VCAM-1 et la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 (E). Forte fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 au sein de lésions athéromateuses exprimant fortement VCAM-1 (Astérisque bleu) en comparaison de plaque avec un faible niveau d'expression de VCAM-1 (Astérisque noir). Barre d'échelle = 500 μm .

Une expression hétérogène de VCAM-1 a été observée par immunohistochimie sur des coupes longitudinales de cosses aortiques de souris ApoE^{-/-} (Figure 81). En effet, l'expression est faible dans certaines lésions (astérisque noir, Figure 81 A et C) et élevée dans d'autres (astérisque bleu, Figure 81 A et C). D'autre part, l'expression de VCAM-1 n'est pas restreinte à l'endothélium mais est également retrouvée au sein des lésions, ce qui est cohérent avec les données de la littérature selon lesquelles VCAM-1 peut être exprimée à la fois par les cellules endothéliales, les CMLs et les macrophages au sein de la plaque d'athérome. Les quantifications des autoradiographies ont confirmé la relation entre le niveau d'expression de VCAM-1 et la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 (Figure 81-E). Une fixation importante de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 a été observée dans les lésions athéromateuses exprimant fortement VCAM-1 ($3,2 \pm 0,3\%$ DI/g) ($P < 0,001$) et une faible captation de ^{99m}Tc -VCAM1-5 a été observée dans les lésions exprimant faiblement VCAM-1 ($1,4 \pm 0,2\%$ DI/g) (Figure 81-B et D).

II.A.3.2 Evaluation non invasive d'un traitement antiathérogène de référence, l'atorvastatine.

Tableau 1 : Effets du traitement aux statines sur le taux de cholestérol et le développement des lésions athéromateuses au sein des valves aortiques de souris ApoE^{-/-}.

Paramètres	Contrôle	Traité	% (Traité vs ctrl)
Cholestérol total, temps basal (mmol/l)	20,3 ± 2,2	18,8 ± 2,2	NS
Cholestérol total, temps final (mmol/l)	85,5 ± 8,1	60,7 ± 6,6	-29,1 (P= 0,034)
Surface des lésions (mm²)	1,07 ± 0,11	0,70 ± 0,07	-33,9 (P= 0,011)

Des taux similaires de cholestérol total ont été observés entre les deux groupes au temps basal (20,3 ± 2,2 mmol/l vs 18,8 ± 2,2 mmol/l). La consommation d'atorvastatine a été de 12,9 ± 0,2 mg/kg/j/animal et a eu pour effet de faire diminuer le taux de cholestérol total de 29,1% en comparaison du groupe contrôle, 20 semaines après le début du traitement (85,5 ± 8,1 mmol/l vs 60,7 ± 6,6 mmol/l, P=0,034). Cette réduction du taux de cholestérol a induit une diminution significative de 33,9% de la surface des lésions pour le groupe traité en comparaison du groupe contrôle (1,07 ± 0,11 mm² vs 0,7 ± 0,07 mm²; P=0,011) (Tableau 1).

II.A.3.2.1 Quantification in vivo : Imagerie SPECT/CT.

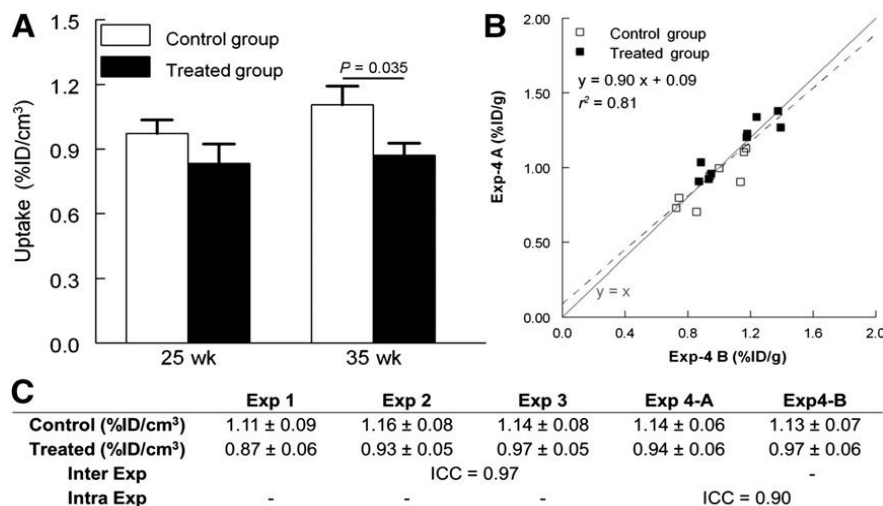


Figure 82 : Quantification SPECT/CT. L'imagerie de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 a permis de suivre avec succès l'effet anti-athérogène de l'atorvastatine chez des souris ApoE^{-/-}. La diminution significative de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 chez les souris traitées a été observée avec succès in vivo (A). La méthode de quantification est reproductible, comme le montre la corrélation intra-observateur (B), avec des coefficients inter et intra-observateur ≥ 0.90 (C).

^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 a permis d'évaluer de manière non invasive l'effet de l'atorvastatine sur le développement des plaques d'athérome. Sa fixation au

niveau de l'aorte ascendante était très nettement visible sur l'image SPECT/CT et a pu être quantifiée. Si chez les souris âgées de 25 semaines, une simple tendance à la diminution de la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ a été observée pour les souris traitées ($0,83 \pm 0,09\%$ DI/cm³ vs $0,97 \pm 0,06\%$ DI/cm³), à 35 semaines en revanche, cette diminution a été significative en comparaison du groupe contrôle ($0,87 \pm 0,06\%$ DI/cm³ vs $1,11 \pm 0,09\%$ DI/cm³, $P=0,035$). L'injection d'un produit de contraste précédant l'acquisition des images CT a permis de délimiter précisément l'aorte ascendante et de quantifier la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ de manière reproductible, avec un coefficient de corrélation inter- et intra-observateur de 0,97 et 0,90 respectivement (Figure 82).

II.A.3.2.2 Quantification ex vivo

II.A.3.2.2.1 Biodistribution par prélèvements d'organes

Tissus	Contrôle	Traité
Aorte ascendante	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1*
Sang	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,0
Cœur	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0
Poumon	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Foie	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Muscle squelettique	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1
Glande salivaire	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1
Thyroïdes	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,2
Estomac	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Bile	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1
Rein	138,7 ± 8,6	165,0 ± 6,8
Rate	8,8 ± 0,7	7,9 ± 0,5
Thymus	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,2
Moelle osseuse	4,0 ± 0,4	4,1 ± 0,7
Ganglions lymphatiques	2,8 ± 0,3	2,7 ± 0,2

Tableau 2 : Biodistribution par prélèvements d'organes, 3h après l'injection de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ chez des souris ApoE^{-/-}. Les résultats ont été exprimés en % DI/g. * $P<0,05$ vs le groupe contrôle.

Les résultats sont présentés dans le tableau 2 et sont en accord avec les résultats obtenus *in vivo*, avec une diminution significative de 24 % de la fixation aortique de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ pour le groupe traité en comparaison du groupe contrôle. Le traceur est majoritairement éliminé par le rein ($138,7 \pm 8,6$ % DI/g), avec une fixation minimale dans tous les autres tissus prélevés, exceptés les organes lymphoïdes (>2% DI/g). En effet, la fixation dans la rate, les ganglions, la

moelle osseuse et le thymus a été quantifiée au compteur gamma à $8,8 \pm 0,7\%$ DI/g; $2,1 \pm 0,2\%$ DI/g; $4,0 \pm 0,4$ et $2,8 \pm 0,3\%$ DI/g respectivement.

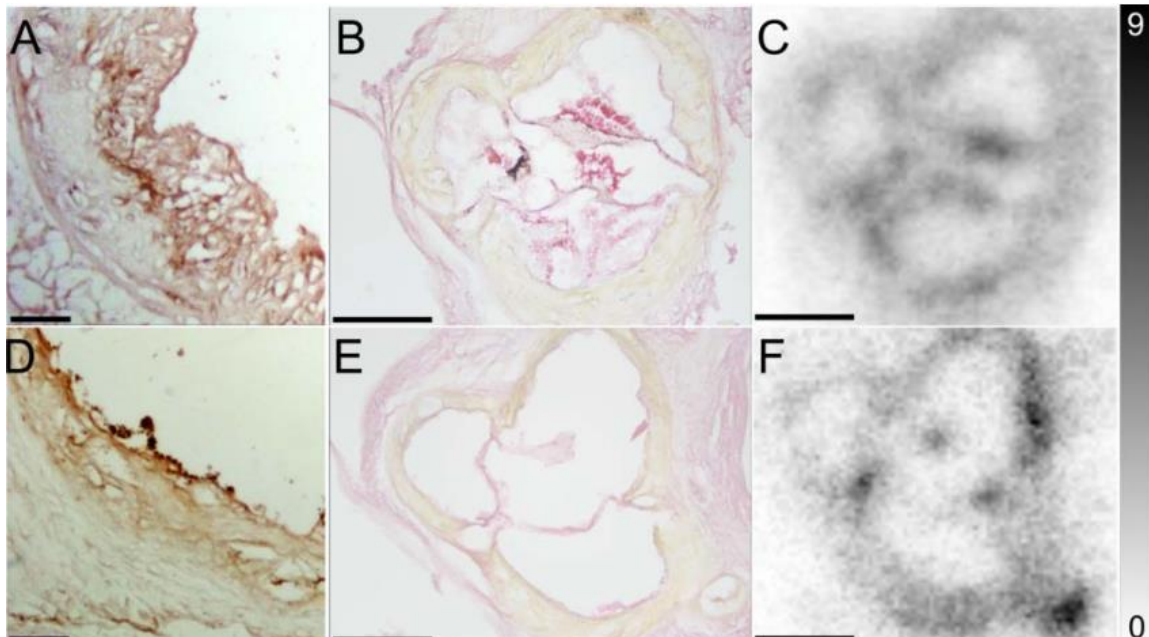


Figure 83 : Quantification ex vivo de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$. Images représentatives de coupes transversales de valves aortiques chez des souris $\text{ApoE}^{-/-}$ du groupe contrôle (A, B, C) ou du groupe traité (D, E, F). Immunomarquage de VCAM-1 centré sur une cuspide aortique (A, D). Coloration trichrome (B, E) et autoradiographie effectuées sur des coupes adjacentes (C, F). Min=0% DI/g, Max=9% DI/g. Barre d'échelle = 100 μm (A, D) et 500 μm (B, C, E, F).

Tableau 3 : Fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ déterminée ex-vivo par autoradiographie.

Paramètres	Unités	Contrôle	Traité	%
Fixation totale	% DI par coupe ($0,10^6$)	$8,9 \pm 1,2$	$5,2 \pm 0,9$	-41,5 ($P=0,024$)
Concentration	% DI/g	$2,1 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	NS

Pour les deux groupes, une forte fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ a été observée dans les plaques d'athérome présentes sur les valves aortiques (Figure 83). Une diminution significative de 41,5% de la fixation totale du traceur a été mesurée pour le groupe traité à l'atorvastatine par rapport au groupe contrôle (Tableau 3). La fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ a été de $8,9 \cdot 10^{-5} \pm 1,1 \cdot 10^{-5}$ % DI/coupe pour le groupe contrôle et de $5,2 \cdot 10^{-5} \pm 0,9 \cdot 10^{-5}$ % DI/coupe pour le groupe traité. Il est intéressant de noter qu'une tendance à la diminution de la concentration en $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ a été observée pour le groupe traité en comparaison du groupe contrôle lorsque sa fixation a été corrigée de la surface des plaques ($1,8 \pm 0,2$ % DI/g vs $2,1 \pm 0,2$ % DI/g ; $P= \text{NS}$).

II.A.3.3 Comparaison entre les quantifications *in vivo* et *ex vivo*

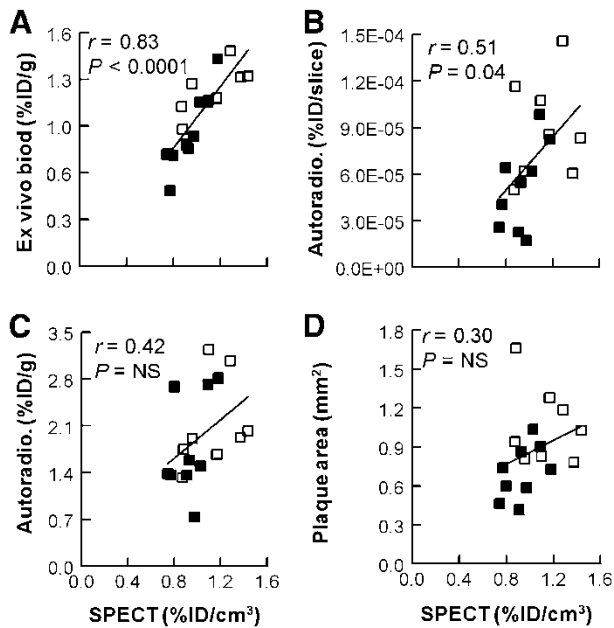


Figure 84 : Comparaison entre les quantifications déterminées par imagerie SPECT/CT (*in vivo*) et *ex vivo* au compteur gamma (A), en autoradiographie (B et C) de la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ localisés au sein des lésions athéromateuses de l'aorte ascendante et également de la

les quantifications déterminées par autoradiographie exprimées en fixation totale ($r = 0,51$; $P = 0,04$) (Figure 83-B) plutôt qu'en fonction de la concentration en traceur ou de la surface des plaques ($P = \text{NS}$) (Figure 84-C et D).

Les quantifications de la fixation du traceur réalisées *in vivo*, ont été comparées aux différentes méthodes de quantification *ex vivo* (biodistribution, autoradiographie) et également à la surface des plaques. Une forte corrélation entre la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ déterminée *ex vivo* au compteur gamma et par imagerie SPECT/CT a été observée ($r = 0,83$; $P < 0,0001$) (Figure 84-A). De plus, les quantifications des images SPECT/CT de la fixation du radiotracer au niveau du sinus aortique ont été corrélées de manière significative avec

II.A.4 Discussion

L'expression de VCAM-1 est spécifique des phénomènes inflammatoires, et cette cible représente par conséquent un biomarqueur pertinent pour l'imagerie moléculaire des plaques d'athérome. Dans cette étude, l'atorvastatine a significativement diminué la surface des lésions athéromateuses localisées au sein du sinus aortique de souris ApoE^{-/-} sous régime Western. Cet effet a été suivi avec succès et de manière non invasive par l'imagerie moléculaire de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$. L'imagerie anatomique aux rayons X a été utilisée après l'injection rétro-orbitale d'un produit de contraste pour la détermination des volumes d'intérêt sur les images obtenues *in vivo*, permettant ainsi d'obtenir une méthode robuste et reproductible de quantification des images nucléaires. La quantification de l'activité du traceur dans l'aorte ascendante sur les images nucléaires SPECT a montré une corrélation positive et significative entre ces

valeurs et les valeurs d'activité en traceur déterminées *ex vivo* en biodistribution par prélèvements d'organes. En théorie, les quantifications *in vivo* de la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 devraient être le reflet direct de l'expression de VCAM-1 au sein des lésions. Néanmoins, du fait de la faible taille des lésions athéromateuses, et de la limite de résolution de la caméra (environ 1 mm), l'effet de volume partiel entraîne une sous-estimation de l'activité mesurée lorsque le volume de l'échantillon évalué est inférieur à deux fois la résolution de la caméra (Hoffman et al., 1979). En effet, l'échantillon n'occupe alors pas la totalité d'un voxel et son activité est diluée dans l'activité des tissus environnants (sang, artère saine). Par conséquent, les quantifications *in vivo* dépendent non seulement de l'expression de VCAM-1 au sein des lésions (concentration) mais également du volume des lésions au sein des régions d'intérêt et donc de leur surface. Ce phénomène a été observé dans notre étude, où les quantifications *in vivo* corrélaient significativement à la fixation totale (produit de la concentration par le volume des lésions) de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 dans le sinus aortique plutôt qu'à sa concentration (% DI/g) ou à la surface des lésions.

Les résultats de cette étude ont montré l'effet antiathérogène des statines, agissant à la fois sur le taux de cholestérol et sur l'inflammation par leurs effets pléiotropes. Nakashima et al. ont observé des taux de cholestérol similaires pour ce même modèle de souris, compris entre 22 et 114 mmol/l, en accord avec les $85,5 \pm 8,1$ mmol/l observés dans notre étude (Nakashima et al., 1994). L'ajout d'atorvastatine à 0,01% dans le régime Western a eu pour effet de diminuer le taux de cholestérol de 29% et la surface des lésions athéromateuses de 40%, un résultat semblable aux observations publiées par Nahrendorf et al. en 2006 (Nahrendorf et al., 2006) ou Khanicheh et al. en 2013 (Khanicheh et al., 2013). En revanche, une réduction modérée de l'expression de VCAM-1 dans les plaques d'athérome a été observée, contrairement aux résultats d'autres études présentant des diminutions plus importantes de cette expression, comprises entre 30% et 80% (Nahrendorf et al., 2009 ; Khanicheh et al., 2013). Tan et al. ont observé l'effet anti-athérogène de l'atorvastatine (10 mg/kg/j) chez des souris ApoE^{-/-} sous régime Western, en utilisant un anticorps monoclonal humanisé radiomarqué au ^{99m}Tc et dirigé contre VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A), médiateur de l'angiogenèse (Tan et al., 2017). Dans cette étude, l'effet anti-athérogène de l'atorvastatine médié par son action anti-

angiogénique a été suivi avec succès. D'autres études utilisant l'imagerie de VCAM-1, dont celle de Nahrendorf et al., ont montré une diminution significative au sein des lésions athéromateuses de la fixation de ^{18}F -4V, peptides linéaires tétramériques ciblant VCAM-1, chez des souris ApoE^{-/-} traitées aux statines (Nahrendorf et al., 2009). La durée du régime, l'âge des souris et la posologie utilisée étaient identiques, seule la modalité d'imagerie et le radiotracer différaient entre les deux études.

Dans notre étude, nous avons pu démontrer la sensibilité de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -cAbVCAM1-5 pour l'imagerie des lésions athéromateuses à l'aide d'une thérapie de référence, l'atorvastatine, chez des souris ApoE^{-/-} sous régime Western. Vingt semaines de régime auront été nécessaires pour observer *in vivo*, une diminution significative de la fixation du traceur au sein des lésions athéromateuses de l'aorte ascendante. Ces temps d'étude assez longs ne permettent pas d'évaluer efficacement de nouvelles thérapies. C'est dans cette perspective que nous avons souhaité confirmer la sensibilité de notre outil d'imagerie à l'aide d'une seconde thérapie de référence, l'ézétimibe, sur un modèle de souris ApoE^{-/-} sous régime Paigen (pro-athérogène), accélérant la formation des lésions.

Ces travaux de recherche ont fait l'objet d'une publication dans la revue "journal of nuclear medicine" en 2014 (Broisat A, Toczek J, Dumas L, et al., 2014).

II.B Evaluation de la sensibilité de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ chez un modèle de souris ApoE^{-/-} sous régime Paigen traitées à l'ézétimibe.

II.B.1 *Objectif*

Dans le but de confirmer la sensibilité de l'imagerie de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ *in vivo* chez un modèle de souris ApoE^{-/-}, une autre classe médicamenteuse d'hypolipémiants a été utilisée.

L'ézétimibe est un inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol. Son effet anti-athérogène chez la souris n'est plus à démontrer (Davis et al., 2011) (Cf revue bibliographique, chapitre III.A.1.2, page 95). Il est principalement médié par la réduction du taux de cholestérol plasmatique (Davis et al., 2001).

L'objectif de cette étude a été d'évaluer la sensibilité de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ chez un modèle de souris ApoE^{-/-}, couplé à un régime pro-athérogène, le régime Paigen.

A la différence du régime hypercholestérolémiant Western utilisée dans la précédente étude, le régime Paigen contient de l'acide cholique. L'acide cholique fait partie des deux acides biliaires majeurs qui potentialisent l'absorption du cholestérol. Il favorise la génération de micelles au sein des entérocytes, augmentant ainsi l'absorption du cholestérol (Nishina et al., 1990). De plus, ce régime contient 8 fois plus de cholestérol que le régime Western (1,15% vs 0,15%). L'ajout d'acide cholique combiné à un taux de cholestérol important dans le régime a été démontré pour accélérer la formation de lésions athéromateuses (Paigen et al., 1985). Ceci, dans l'objectif d'évaluer de nouvelles thérapies anti-athérogènes sur des temps plus courts.

II.B.2 *Matériel et méthodes*

II.B.2.1 Animaux et régime

Toutes les procédures expérimentales ont été acceptées par le comité d'éthique de l'Université Grenoble Alpes (ComEth') et validées par le ministère de la recherche.

Des souris femelles âgées de 7 semaines ont été utilisées dans cette étude. Des souris ApoE^{-/-} (n=35) ont été nourries avec un régime Paigen pro-athérogène

(15% de lipides, 1,25% de cholestérol, 0,5% acide cholique) pendant 6 semaines, dont 16 d'entre elles ont été traitées à l'ézétimibe (0,005%, 7 mg/kg/j).

Dans une première partie d'étude, 20 souris ApoE^{-/-} ont été utilisées pour évaluer la fixation *in vivo* de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 par imagerie SPECT/CT (groupe Paigen n=10, groupe Paigen+ ézétimibe n=10).

Dans une deuxième partie d'étude, 15 souris ApoE^{-/-} ont été dédiées à la comparaison de la fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 et de l'expression de VCAM-1 déterminée par ELISA (groupe Paigen n=6, groupe Paigen+ ézétimibe n=9). Des souris C57bl/6J (n=6) ont été nourries avec un régime standard (groupe contrôle).

La masse corporelle et la consommation de nourriture ont été mesurées 1 fois par semaine. Le protocole expérimental est résumé dans la figure 85.

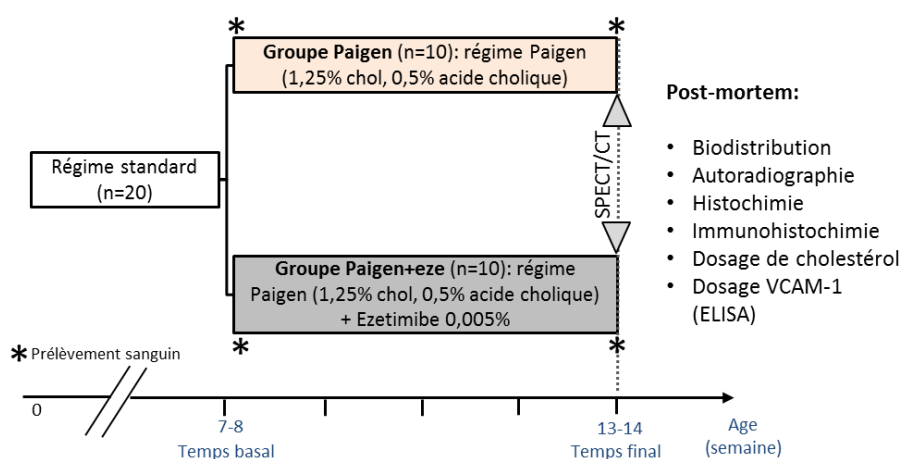


Figure 85 : Protocole expérimental de l'étude.

II.B.2.2 Dosage du cholestérol plasmatique

Le taux de cholestérol plasmatique total a été évalué avant le début du régime (basal) et au temps final de l'étude (final). Après un prélèvement sanguin effectué par incision à l'extrémité de la queue sur des animaux vigiles, le sang a été centrifugé à 2 000g pendant 3 min. Le plasma a été transféré dans des tubes Eppendorf pour être conservé à -80°C. Le dosage a été effectué en utilisant un kit commercial (Cholestérol RTU, Biomérieux). Les données ont été exprimées en g/l.

II.B.2.3 Effet de l'ézétimibe sur les lésions athéromateuses et l'inflammation

II.B.2.3.1 Radiomarquage au technétium^{99m} de cAbVCAM1-5

Le nanobody cAbVCAM1-5 a été radiomarqué au technétium-^{99m} en utilisant la méthode tricarbonyle décrite dans le chapitre III.C.1.2.2, page 220.

II.B.2.3.2 Imagerie SPECT/CT

L'imagerie SPECT/CT a été réalisée sur 20 animaux d'un âge compris entre 13 et 14 semaines, soit 6 semaines après le début du régime.

^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 (47,2 ± 10,7 MBq dans 100 µl) a été administré, dans une veine latérale de la queue de souris vigiles. Deux heures après l'injection, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (1,5-2%) et l'imagerie SPECT/CT a été réalisée (nanoSPECT, Bioscan) en utilisant les paramètres suivants :

SPECT : La caméra, dotée de 4 têtes, était équipée de collimateurs multi-pinholes (9 x 1,2 mm dia). L'acquisition a été réalisée sur 1 champ de vue, avec 24 projections, pour une durée totale de 45 minutes.

CT : L'imagerie aux RX a été réalisée immédiatement après l'injection en bolus de 200µl de produit de contraste (Hexabrix®) dans le sinus rétro-orbitale avec comme paramètres d'acquisition : 65 kvp, 500 ms/projection et 180 projections.

L'analyse des images a été réalisée comme décrit précédemment (Cf chapitre n°II.A.2.4.1, page 172).

II.B.2.3.3 Analyse ex vivo

L'analyse postmortem a été réalisée comme décrit précédemment (Cf chapitre II.A.2.4.2, page 173).

II.B.2.3.3.1 Evaluation de l'expression de VCAM-1 déterminée par ELISA

Trois heures après l'injection de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 (32,3 ± 7,2 MBq), les souris ont été euthanasiées par inhalation de CO₂. Les tissus d'intérêt (valves, crosse aortique, aorte thoracique, aorte abdominale, plasma, rate, thymus, ganglions, muscle squelettique, cœur) ont été rapidement prélevés et pesés, puis placés dans des tubes contenant du NaCl 0,9%, et la fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 a

été déterminée par comptage gamma comme décrit précédemment (Cf chapitre II.A.2.4.2.1, page 173). Les échantillons ont ensuite été immédiatement congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C dans l'attente du dosage ELISA.

Les tissus, à l'exception du plasma, ont été broyés dans un potter en verre contenant 100 µl de tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris·HCl (pH 8,0), 0,5% sodium deoxycholate, et 0,1% SDS, des inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche Applied Science) et 1 mM d'orthovanadate de sodium), puis centrifugés à 10 000 RPM pendant 10 min. Le surnageant a été prélevé et le dosage de VCAM-1 a été réalisé en utilisant le kit sVCAM-1/CD-106 (R&D Systems). Le dosage des protéines totales a été déterminé par micro BCA (Thermo Scientific). Les résultats ont été exprimés en ngVCAM-1/mg tissu.

II.B.2.3.3.2 *Western blot*

Dans le but de tester l'hypothèse d'un effet direct anti-inflammatoire de l'ézétimibe comme suggéré par Muñoz-Pacheco et al., des études *in vitro* ont été réalisées.

Des cellules provenant d'une lignée monocyttaire humaine (THP1) ont été cultivées dans du milieu de culture RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium, 1% de Pénicilline-Streptomycine, à 37°C dans un incubateur humidifié avec 5% de CO₂. 10⁶ cellules ont étéensemencées dans des plaques de culture 6 puits et ont été différenciées en macrophages en présence de phorbol 12-miristate acétate (PMA) à 5 ng/ml pendant 24h avec ou sans ézétimibe (100 nM). Puis les cellules ont été lavées avec du RPMI 1640 et laissées au repos durant 24h. Les THP1 différenciées en macrophage ont été stimulées en présence de TNF-α à 50 ng/ml durant 18h avec ou sans ézétimibe (100 nM). Après traitement, les cellules ont été rincées avec du PBS et lysées en présence de RIPA à -80°C. Le lysat cellulaire a été centrifugé à 10 000g à 4°C pendant 10 min et le surnageant a été récupéré. Les protéines ont été quantifiées par méthode BCA et 30 µg de protéine ont été déposés sur un gel d'acrylamide (7,5% Mini PROTEAN[®], Bio-Rad). En parallèle des échantillons, un marqueur de taille a été déposé (5 µl Prism Ultra Protein Ladder 10-180 kDa, ab116027). Les protéines ont été séparées par une électrophorèse réalisée à 130 V pendant 60 min (Mini PROTEAN[®], Tetra System, BIO-RAD). Une fois séparées, les protéines

ont alors été transférées (Trans-Blot[®], TurboTM Transfert system, Bio-Rad) sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a alors été saturée pendant 1h avec du TBS-Tween 0,1% -BSA 1% sous agitation puis incubée avec un anticorps anti-VCAM-1 (1/1000, Abcam[®] ab134047) pendant une nuit à 4 °C sous agitation. Cette membrane a ensuite été lavée 3 fois 5 min avec du TBS-Tween 0,1%, puis incubée avec un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase de raifort (HRP) (1/2000 Dako), dilué dans la solution de blocage pendant 1 h à TA. La membrane a ensuite été lavée 3 fois 5 min avec du TBS-Tween 0,1%. La révélation a été réalisée à l'aide de l'appareil ChemidocTM MP system (Bio-Rad).

II.B.2.4 Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type. Les valeurs de fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5, déterminées par prélèvements d'organes, autoradiographie ou quantification d'images SPECT, ont été comparées en utilisant un test t pour valeurs appariées (intra-groupe) ou non appariées (inter-groupe). Un test de régression linéaire de Pearson a également été utilisé pour déterminer les différents coefficients de corrélations (comparaison des quantifications *ex vivo* de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 dans l'aorte ascendante vs les quantifications *in vivo* ; comparaison des quantifications de VCAM-1 par dosage ELISA vs la fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 déterminée au compteur gamma dans différents tissus).

II.B.3 Résultats

II.B.3.1 Effet de l'ézétimibe sur le cholestérol plasmatique et la masse corporelle.

Tableau 4 : Effet du traitement à l'ézétimibe sur le taux de cholestérol et la masse corporelle.

Paramètres	Temps	Contrôle	Traité	% (Traité vs ctrl)
Taux de cholestérol plasmatique (g/l)	Basal	6,4 \pm 3,1	7,13 \pm 1,16	NS
	Final	29,0 \pm 3,1	14,6 \pm 2,3	-50 ($P < 0,01$)
Masse corporelle (g)	Basal	19,1 \pm 1,2	18,9 \pm 0,9	NS
	Final	18,4 \pm 0,5	21,0 \pm 0,2	14 ($P < 0,01$)

Les résultats sont présentés dans le tableau 4. Des taux similaires de cholestérol plasmatique ont été observés au temps basal (avant régime Paigen) entre les souris du groupe contrôle (6,4 \pm 3,1 g/l) et les souris du groupe traité (7,13 \pm

1,16 g/l). La dose d'ézétimibe administrée a été en moyenne de 7 mg/kg/j et a eu pour effet de faire diminuer significativement le taux de cholestérol plasmatique de 50% en comparaison des souris contrôles non traitées, 7 semaines après le début du régime et du traitement ($29,0 \pm 3,1$ g/l vs $14,6 \pm 2,3$ g/l ; $P < 0,01$). Au temps final, la masse corporelle des souris du groupe sous ézétimibe a été significativement plus importante que celle des souris du groupe contrôle ($21,0 \pm 0,2$ g vs $18,4 \pm 0,5$ g ; $P < 0,01$).

II.B.3.2 Effet de l'ézétimibe sur l'athérosclérose

II.B.3.2.1 Imagerie *in vivo* SPECT/CT

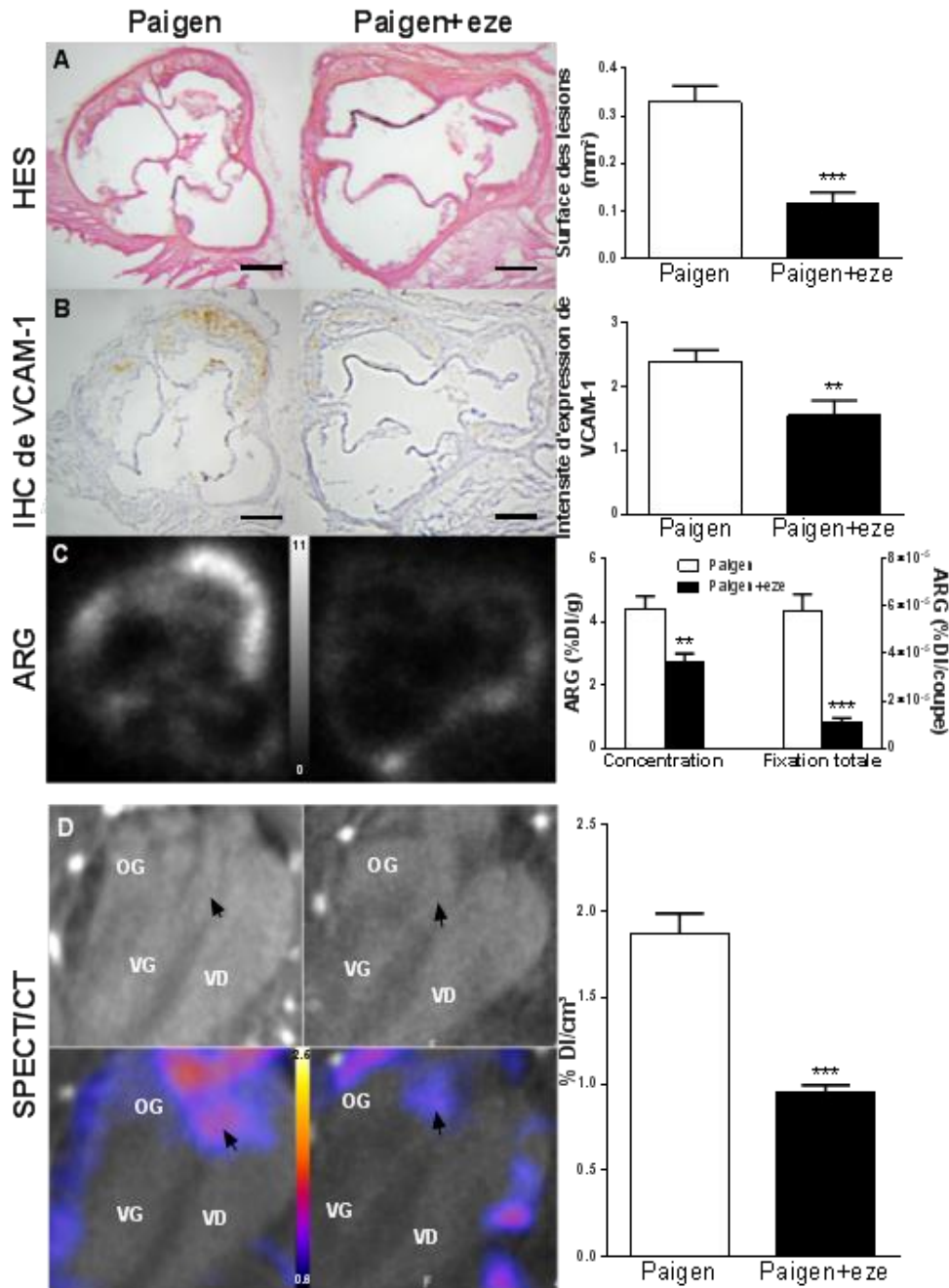


Figure 86 : Effet de l'ézétimibe sur l'inflammation des plaques d'athérome. Les souris $ApoE^{-/-}$ sous régime Paigen ont développé des plaques d'athérome au niveau des valves aortiques (flèche noire) et le traitement à l'ézétimibe a permis de réduire le volume de ces lésions(A), le niveau d'expression de VCAM-1 (B) et la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 déterminée par autoradiographie (C) et par imagerie SPECT/CT (vue coronale) (D) respectivement. Barre d'échelle = 200 μm (moy \pm e.type). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs Paigen. OG = oreillette gauche, VG = ventricule gauche, VD = ventricule droit, HES = hématoxyline éosine safran, IHC = immunohistochimie, ARG = autoradiographie.

L'imagerie non invasive de l'expression de VCAM-1 à l'aide de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 a permis d'évaluer avec succès l'effet de l'ézétimibe sur l'inflammation des plaques d'athérome chez des souris $ApoE^{-/-}$ sous régime Paigen. En effet, après

quantification de la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 au niveau de l'aorte ascendante, une diminution de 49% a été observée pour le groupe ézetimibe en comparaison des souris Paigen ($1,87 \pm 0,11$ % DI/cm³ vs $0,95 \pm 0,04$ % DI/cm³) (Figure 86-D).

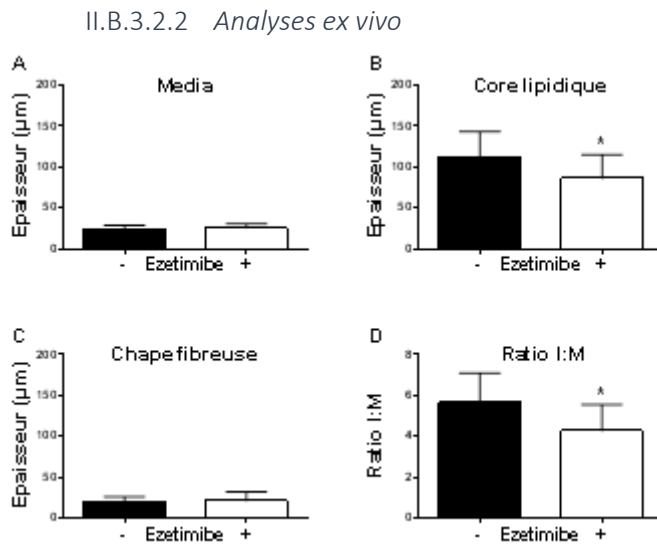


Figure 87 : Quantification de l'épaisseur de la média (A), du cœur lipidique (B), de la chape fibreuse (C) et du ratio intima:media (D) déterminée sur des colorations trichromes (HES) de coupes transversales au niveau des valves aortiques. * $P < 0,05$.

Le régime Paigen a induit la formation précoce de plaque d'athérome au sein des valves aortiques des souris ApoE^{-/-} ($0,33 \pm 0,03$ mm²). L'ézetimibe a diminué de manière significative la surface des lésions de 73% ($0,11 \pm 0,03$ m² ; $P < 0,001$).

Cette diminution de la surface de plaque a été

attribuable en grande partie à la diminution significative de l'épaisseur du cœur nécrotique, et donc du ratio intima-media (Figure 87). En revanche, nous n'avons pas observé d'effet du traitement sur l'épaisseur de la chape fibreuse. Un score d'expression de la protéine VCAM-1 a également été déterminé sur des coupes histologiques adjacentes et a permis de mettre en évidence une réduction significative de l'expression de VCAM-1 pour le groupe traité en comparaison du groupe Paigen ($1,56 \pm 0,23$ vs $2,4 \pm 0,18$; $P < 0,01$) (Figure 86-B). En accord avec ces résultats, la densité de fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 au niveau du sinus aortique déterminée par autoradiographie a été significativement diminuée pour le groupe ézetimibe en comparaison du groupe Paigen ($2,7 \pm 0,29$ % DI/g vs $4,4 \pm 0,38$ % DI/g ; $P < 0,01$) (Figure 86-C).

II.B.3.3 Comparaison entre les méthodes de quantification *in vivo* et *ex vivo*

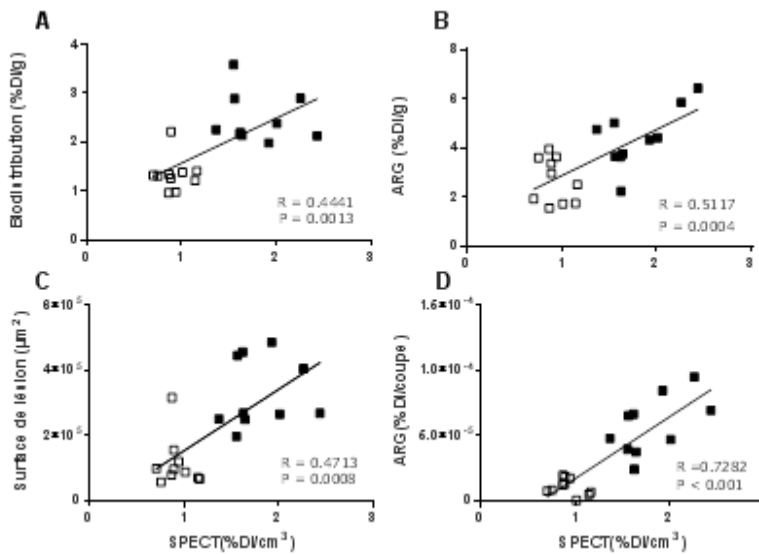


Figure 88 : Comparaison entre les quantifications *in vivo* et *ex vivo* de la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ localisé dans l'aorte ascendante. Les quantifications déterminées par imagerie SPECT/CT ont été comparées à celles réalisées en biodistribution par prélèvements d'organes (A), par autoradiographie exprimée en concentration (B) ou en fixation totale (D), et à la surface des lésions (C). Carré blanc = groupe Paigen + ézétimibe, carré noir =

Une forte corrélation a été observée entre la quantification du radiotracer déterminée *in vivo* et *ex vivo* en biodistribution par prélèvement d'organes au sein des lésions athéromateuses présentes dans l'aorte ascendante ($R=0,44$; $P=0,0013$) (Figure 88-A). Les comparaisons des quantifications SPECT et

autoradiographiques ont mis en évidence une plus forte corrélation lorsque la quantification des autoradiographies est exprimée en % DI/coupe (Figure 88-D) ($R=0,73$; $P<0,001$), c'est-à-dire de la fixation totale, plutôt que de la comparaison entre l'un des 2 paramètres servant à la calculer, à savoir la surface des lésions (Figure 88-C) ($R=0,47$; $P=0,0008$), ou la densité de fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ dans les lésions (Figure 88-B) ($R=0,51$; $P=0,0004$).

II.B.3.4 Expression de VCAM-1 vs fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$

L'expression de VCAM-1 a été investiguée dans divers tissus par ELISA.

De faibles niveaux d'expression de VCAM-1 ont été mesurés dans différents segments d'aortes du groupe contrôle, et également au niveau de l'aorte abdominale saine des groupes Paigen et Paigen+ ézétimibe (Figure 89). Le régime Paigen a induit une augmentation de l'expression de VCAM-1 (d'un facteur 11) en comparaison au groupe contrôle au sein de l'aorte ascendante et de la crosse aortique (Figure 89 A). Cet effet a été significativement inhibé par l'ézétimibe, avec une diminution de 47% de l'expression de VCAM-1 ($2,40 \pm 0,6$

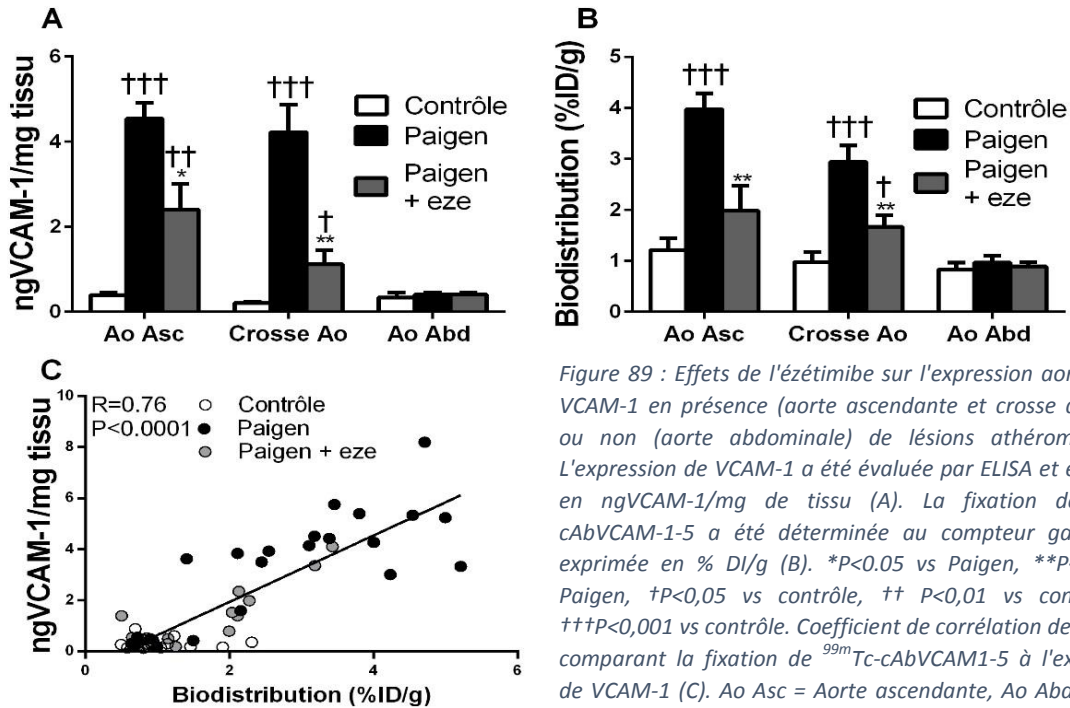


Figure 89 : Effets de l'ézétimibe sur l'expression aortique de VCAM-1 en présence (aorte ascendante et crosse aortique) ou non (aorte abdominale) de lésions athéromateuses. L'expression de VCAM-1 a été évaluée par ELISA et exprimée en ngVCAM-1/mg de tissu (A). La fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM-1-5}$ a été déterminée au compteur gamma et exprimée en % DI/g (B). * $P<0,05$ vs Paigen, ** $P<0,01$ vs Paigen, † $P<0,05$ vs contrôle, †† $P<0,01$ vs contrôle et ††† $P<0,001$ vs contrôle. Coefficient de corrélation de Pearson comparant la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM-1-5}$ à l'expression de VCAM-1 (C). Ao Asc = Aorte ascendante, Ao Abd = Aorte

ng/mg vs $4,54 \pm 0,37$ ng/mg ; $P<0,05$). Ce profil d'expression de VCAM-1 au sein des différents segments aortiques a été corrélé à la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM-1-5}$ (Figure 89-C). En effet, au niveau des lésions athéromateuses, une augmentation significative de la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM-1-5}$ pour les souris du groupe Paigen, et une diminution significative de 37% pour les souris du groupe traité ont été observées en comparaison par exemple à l'aorte ascendante du groupe contrôle $3,97 \pm 0,31\%$ DI/g vs $1,21 \pm 0,23\%$ DI/g $P<0,001$ et $1,98 \pm 0,5\%$ DI/g vs $1,21 \pm 0,23\%$ DI/g $P<0,01$ respectivement (Figure 89-B). Par conséquent, la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM-1-5}$ corrèle fortement à l'expression de VCAM-1 dans l'aorte ($R=0,76$; $P<0,0001$) (Figure 89-C). Il a également été observé une augmentation de l'expression de VCAM-1 induite par le régime Paigen dans d'autres tissus d'intérêt, avec une augmentation significative pour le foie, la rate, le thymus et le cœur (Figure 90). Cet effet a été diminué de manière significative par l'ézétimibe dans le cœur, le foie, le thymus et le muscle. De manière similaire à ce que nous avons pu observer dans l'aorte, la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM-1-5}$ corrèle fortement à l'expression de VCAM-1 dans les différents tissus prélevés ($R=0,69$; $P<0,0001$) (Figure 90-C). Une augmentation significative de la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM-1-5}$ a été observée dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques des souris du groupe Paigen. L'ézétimibe a

inhibé cet effet avec une diminution significative de la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 pour le thymus, le cœur et le muscle.

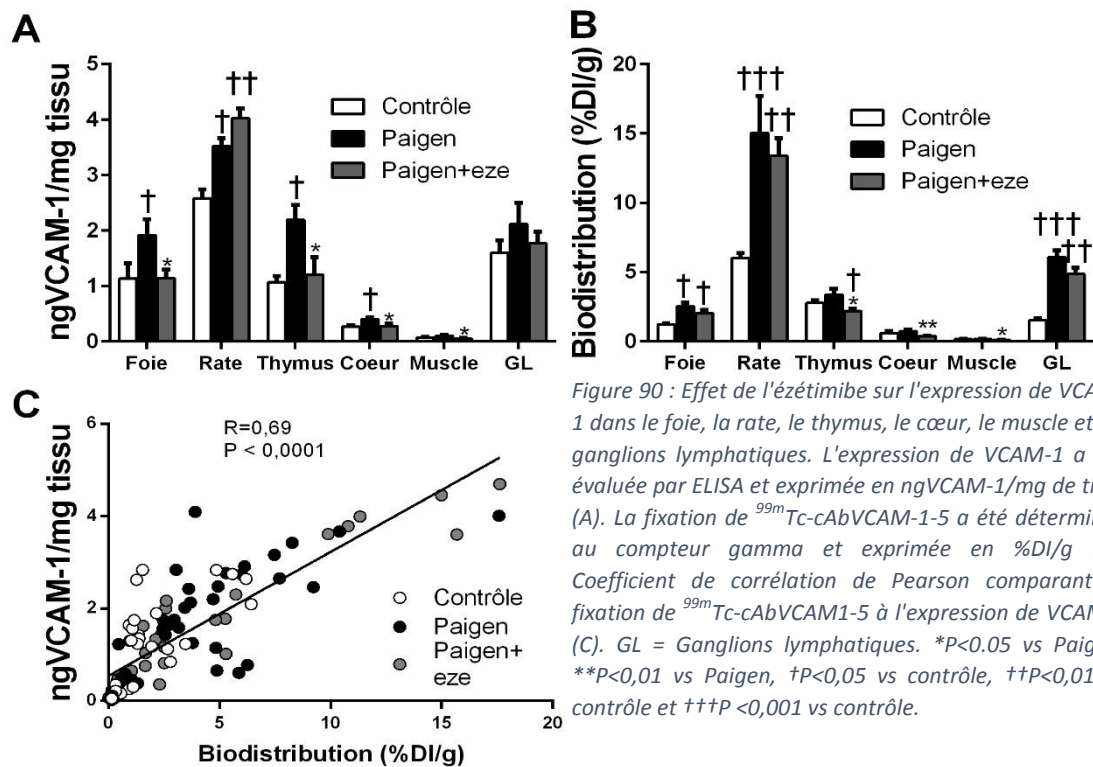


Figure 90 : Effet de l'ézétimibe sur l'expression de VCAM-1 dans le foie, la rate, le thymus, le cœur, le muscle et les ganglions lymphatiques. L'expression de VCAM-1 a été évaluée par ELISA et exprimée en ngVCAM-1/mg de tissu (A). La fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 a été déterminée au compteur gamma et exprimée en %DI/g (B). Coefficient de corrélation de Pearson comparant la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 à l'expression de VCAM-1 (C). GL = Ganglions lymphatiques. *P<0,05 vs Paigen, **P<0,01 vs Paigen, †P<0,05 vs contrôle, ††P<0,01 vs contrôle et †††P <0,001 vs contrôle.

II.B.3.5 Effets anti-inflammatoires de l'ézétimibe

Suites aux résultats des autoradiographies présentant une diminution significative de la densité de fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 pour les souris traitées à l'ézétimibe, des études *in vitro* ont été réalisées afin d'évaluer un possible effet anti-inflammatoire direct de l'ézétimibe. Pour cela, des monocytes humains (THP1) ont été cultivés, différenciés en macrophages et stimulés au TNF- α afin d'induire l'expression de la protéine d'adhésion cellulaire VCAM-1 (Figure 90). En présence d'ézétimibe, l'expression cellulaire de VCAM-1 a été diminuée de 18% en comparaison des cellules non traitées (Figure 91).

PMA	-	+	+
TNF- α	-	+	+
Eze 100 nM	-	-	+
VCAM-1			
Actine			

Figure 91 : Effet anti-inflammatoire direct de l'ézétimibe, déterminé *in vitro* sur des monocytes humains THP-1. Les cellules THP-1 ont été différenciées en macrophages par l'incubation de PMA durant 24h, puis stimulées au TNF- α pendant 24h. Les expressions de VCAM-1 et de l'actine ont été déterminées par western blot.

II.B.4 Discussion

L'ézétimibe agit principalement au niveau du tube digestif, et va inhiber l'absorption du cholestérol par les entérocytes. Il est utilisé conjointement aux statines pour diminuer le taux de cholestérol et ainsi stabiliser les lésions athéromateuses. Cette étude avait pour but d'évaluer la sensibilité de l'imagerie de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 chez des souris ApoE^{-/-} sous régime Paigen, traitées ou non avec de l'ézétimibe. Ce traitement a réduit fortement le taux de cholestérol (-50%) en comparaison du groupe contrôle, résultant en une réduction importante de la surface des lésions athéromateuses. Ces effets anti-athérogènes ont permis d'évaluer la capacité du radiotracer à quantifier l'effet d'un traitement anti-athérogène sur un modèle de souris ApoE^{-/-} sous régime Paigen.

Les taux de cholestérol observés dans notre étude pour le groupe Paigen étaient similaires aux données de la littérature. Ishibashi et al ont observé des taux de cholestérol plasmatique d'environ 70 mg/dl, 2 fois supérieurs aux taux de cholestérol obtenus dans notre étude (30 mg/dl) mais qui restent cependant bien supérieurs aux taux de cholestérol plasmatique obtenus chez des souris ApoE^{-/-} sous régime Western (10 mg/dl) (Ishibashi et al., 2011). Concernant la surface des lésions athéromateuses, Chamberlain et al. ont observé, après 8 semaines de régime Paigen chez des souris ApoE^{-/-}, des surfaces de lésions athéromateuses d'environ 0,30 mm², similaires aux 0,33 mm² obtenus dans notre étude chez des souris ApoE^{-/-} non traitées (Chamberlain et al., 2009).

Fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 dans les lésions aortiques

La diminution de la surface des lésions a été quantifiée *in vivo* (SPECT/CT) par l'imagerie de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 au sein des valves aortiques et de l'aorte ascendante. Les quantifications basées sur les images CT ont confirmé l'effet anti-athérogène de l'ézétimibe sur le développement des lésions athéromateuses, avec une diminution de moitié de la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 en comparaison au groupe Paigen non traité. L'imagerie de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 a donc été suffisamment sensible pour valider de manière non invasive l'action anti-athérogène de l'ézétimibe chez des souris ApoE^{-/-} sous régime Paigen.

La sensibilité de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ pour l'imagerie des lésions aortiques avait déjà été démontrée chez des souris $\text{ApoE}^{-/-}$ traitées aux statines (Broisat et al., 2014). Comme dans la précédente étude, la quantification par imagerie SPECT a été bien corrélée aux quantifications *ex vivo*, et la meilleure corrélation a été obtenue en comparant la quantification par imagerie SPECT à la quantité totale de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ fixée dans les plaques des valves aortiques, déterminée par autoradiographie. Cette nouvelle étude a donc confirmé que l'imagerie de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ reflétait la quantité totale de VCAM-1 dans les lésions aortiques des souris, cette mesure dépendant à la fois du volume des lésions et de la densité de VCAM-1. La sensibilité de l'imagerie de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$, préalablement validée en utilisant des statines, a donc été confirmée dans cette étude par l'utilisation d'une seconde thérapeutique de référence, l'ézétimibe.

Toutefois, dans l'étude précédente, l'effet des statines a été évalué chez des souris $\text{ApoE}^{-/-}$ placées sous régime Western pour une durée de 20 semaines, alors que dans cette nouvelle étude, l'effet de l'ézétimibe a été évalué chez des souris $\text{ApoE}^{-/-}$ sous régime Paigen pendant 6 semaines. L'utilisation du régime Paigen, plus athérogène, a donc permis de réduire de manière considérable la durée de l'étude.

Effet pro-inflammatoire du régime Paigen

Le régime Paigen a entraîné, chez les animaux du groupe contrôle, une inflammation généralisée, comme en témoignent les résultats obtenus par dosage ELISA de VCAM-1 dans différents tissus. Ceci s'est traduit par une augmentation de la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ non seulement au niveau des lésions athéromateuses, mais également dans d'autres tissus tels que le foie ou le cœur. Cette action pro-inflammatoire du régime Paigen est en accord avec les données de la littérature. Qin et al. ont décrit une inflammation hépatique importante chez des souris C57Bl/6J placées sous régime Paigen pendant 5 semaines (Qin et al., 2005). De plus, Vergnes et al. ont démontré que l'action pro-inflammatoire de ce régime dépendait surtout de l'association de l'acide cholique et du cholestérol puisque lorsque l'un de ces deux composants était retiré, l'expression de VCAM-1 en était fortement diminuée (Vergnes et al., 2003).

La biodistribution de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 corrèle fortement au niveau d'expression tissulaire de VCAM-1 dans de nombreux tissus, confirmant que la fixation de celui-ci, en dehors des organes d'élimination, est bien spécifique de sa liaison à VCAM-1.

Imagerie de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 chez des souris sous régime

L'inflammation systémique induite par le régime Paigen dans différents tissus non-cibles constitue une limitation au modèle. En effet, il n'est pas souhaitable, pour l'imagerie comme pour l'évaluation d'une thérapie, d'induire de l'inflammation de manière généralisée dans l'organisme des souris. Néanmoins, cette étude a permis de démontrer que ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 pouvait être employé pour l'imagerie de VCAM-1, et donc du phénomène inflammatoire, dans des tissus autres que l'aorte, comme le foie ou le cœur. Cela signifie que ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 pourrait potentiellement être utilisé pour l'imagerie de pathologies inflammatoires touchant ces tissus, telles que le rejet de greffe, ou la stéatose hépatique non alcoolique (NASH : non-alcoholic steatohepatitis). Des études visant à évaluer le potentiel de l'imagerie de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 dans cette dernière sont d'ailleurs actuellement en cours au LRB.

Il est également intéressant de noter que l'ézétimibe a réduit la formation des plaques d'athérome, mais également la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5, et donc le taux d'expression de VCAM-1, dans de nombreux tissus. En effet, malgré la présence du régime Paigen, la biodistribution de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 chez les animaux traités à l'ézétimibe est similaire à celle historiquement observée chez des souris ApoE^{-/-} placées sous régime Western. Ceci suggère que l'inflammation généralisée observée chez les souris ApoE^{-/-} placées sous régime Paigen est la résultante de la présence de l'acide cholique et de l'hypercholestérolémie, puisque la présence de l'acide cholique seul ne suffit pas à entraîner une élévation de la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5, et donc du taux d'expression de VCAM-1, chez les souris du groupe traité à l'ézétimibe. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Vergnes et al. qui ont décrit une action pro-inflammatoire généralisée du régime Paigen lorsque l'acide cholique et le cholestérol étaient présents dans le régime (Vergnes et al., 2003).

Enfin, la diminution significative de la densité de fixation aortique de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 observée pour le groupe traité est le reflet d'une réduction de la

densité d'expression de VCAM-1, indépendante de la diminution de la surface des lésions athéromateuses. Cette réduction de l'expression de VCAM-1 pourrait être attribuable soit à la diminution de la lipotoxicité associée à la réduction importante du taux de LDL-C, soit, comme le suggèrent certaines études, à un effet anti-inflammatoire direct. En effet, Muñoz-Pacheco et al. ont observé *in vitro*, une réduction de l'expression de molécules d'adhésion cellulaire telles qu'ICAM-1 et son récepteur, l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$, sur des monocytes (THP-1) traités à l'ézétimibe, inhibant leur différenciation en macrophages et réduisant l'expression du miRNA-155, impliqué dans la progression des lésions athéromateuses (Muñoz-Pacheco et al., 2012). Cerda et al. ont également mis en évidence un effet anti-inflammatoire médié par la diminution de l'expression d'un miRNA pro-athérogène (miRNA-221) sur des cellules endothéliales humaines stimulées au TNF- α (Cerda et al., 2014). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans notre étude où l'ézétimibe a induit une réduction de l'expression de VCAM-1 par les macrophages, ce qui pourrait en partie expliquer la diminution d'expression de VCAM-1 observée au sein des lésions athéromateuses des valves aortiques et de la crosse aortique.

La confirmation, par cette étude, de la sensibilité de $^{99\text{m}}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ pour l'imagerie du processus inflammatoire des lésions athéromateuses nous permet d'envisager d'évaluer de nouvelles thérapies potentiellement anti-athérogènes, tels que les inhibiteurs au récepteur à l'ADP, P2Y_{12} .

Ces travaux de recherche ont fait l'objet d'une publication dans la revue "journal of nuclear medicine" en 2017 (Dumas et al., 2017).

II.C Evaluation des effets antiathérogènes des antagonistes au récepteur P2Y₁₂ chez un modèle de souris ApoE^{-/-} sous régime Paigen.

II.C.1 *Objectif*

L'athérosclérose est une pathologie essentiellement médiée par deux mécanismes que sont l'hypercholestérolémie et l'inflammation. Malgré l'efficacité des dernières thérapies hypocholestérolémiantes sur la réduction du risque cardiovasculaire (Ference et al., 2017), le risque résiduel reste important (Pradhan et al., 2018). De nouvelles thérapies ciblant le processus inflammatoire dans la maladie athéro-thrombotique sont à l'étude, notamment celles inhibant la cascade inflammatoire en amont de la CRP, biomarqueur de l'inflammation systémique (Ridker et al., 2016). L'étude CANTOS fut la première étude clinique randomisée en double aveugle à mettre en évidence l'effet cardioprotecteur d'un traitement inhibant l'IL-1 β chez des patients victimes d'un SCA (Ridker et al., 2017).

Le récepteur à l'ADP, P2Y₁₂, fait partie des potentielles cibles thérapeutiques agissant sur l'inflammation dans l'athérosclérose. Ce récepteur joue un rôle essentiel dans l'agrégation plaquettaire (Cf revue bibliographique, chapitre III.B.4.1, page 113). Au-delà de leur fonction principale dans l'hémostase, les plaquettes sont impliquées dans le développement de l'athérosclérose, notamment par leur interaction avec les leucocytes et par leur adhésion à l'endothélium vasculaire (Davì et Patrono, 2007 ; Beer et Bonetti, 2018). En effet, l'activation plaquettaire induit la libération de granules α contenant la P-sélectine, des cytokines pro-inflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène, activateurs de l'endothélium vasculaire et des leucocytes. De nombreux médiateurs sont impliqués dans l'initiation de l'activation plaquettaire (ADP, THXA₂, collagène), et l'amplification de la réponse est médiée principalement par l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G, appelé P2Y₁₂.

A ce jour, l'inhibition du récepteur P2Y₁₂ reste le traitement thérapeutique le plus efficace en combinaison à l'aspirine dans la prévention de l'athérombose chez les patients victimes d'un SCA ou nécessitant une intervention coronarienne percutanée (Valgimigli et al., 2018). Certaines études suggèrent un effet

bénéfique à long terme, médié par des effets pléiotropes ("effets adénosines"), indépendants de leur action sur l'agrégation plaquettaire (Bonello et al., 2014). L'expression du récepteur P2Y₁₂ n'est pas limitée aux plaquettes. Les CMLs, les macrophages et les CDs expriment également ce récepteur (Adamski et al., 2014). Des études menées chez la souris ApoE^{-/-} ont mis en évidence un effet anti-athérogène lié à la délétion du gène P2Y₁₂ (Li et al., 2012). Il semblerait que ce mécanisme soit plus particulièrement médié par l'inhibition du récepteur exprimé à la surface des cellules de la paroi vasculaire (CMLs, CEs et certaines cellules de l'immunité) durant la progression des lésions (West et al., 2014). Néanmoins, des résultats contradictoires ont été rapportés dans des études évaluant l'inhibition pharmacologique de ce récepteur (Ticagrelor, Prasugrel, Clopidogrel et Cangrelor) sur le développement des lésions. West et al. n'ont pas observé d'effet anti-athérogène du Ticagrelor ou du Clopidogrel sur la surface des lésions athéromateuses chez des souris ApoE^{-/-} sous régime Western, tandis que Afek et al. ont montré une diminution significative de la surface des lésions chez des souris ApoE^{-/-} traitées au Clopidogrel (Afek et al., 2009).

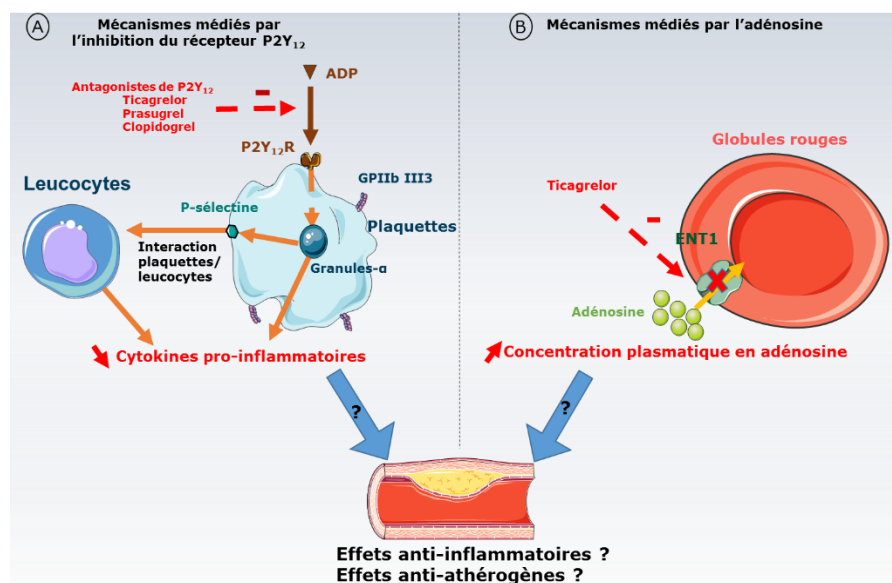


Figure 92 : Mécanismes potentiels anti-athérogène et anti-inflammatoire du Ticagrelor et du Prasugrel. Le premier médié par l'inhibition du récepteur P2Y₁₂, entraînant l'inactivation des plaquettes (A) et le second, propre au Ticagrelor, inactivant le transporteur à l'adénosine (ENT1) (B).

Les potentiels effets anti-athérogène et anti-inflammatoire du Ticagrelor et du Prasugrel ont des mécanismes communs, médiés par l'inhibition du récepteur à l'ADP, P2Y₁₂, exprimé à la surface des plaquettes mais également des CMLs, des CEs et certaines cellules de l'immunité. Un deuxième mécanisme, propre au Ticagrelor a été rapporté dans la littérature (Bonello et al., 2014), et implique

l'inhibition du transporteur aux nucléotides (ENT1), entraînant une augmentation de la concentration plasmique d'adénosine, induisant des effets pléiotropes par l'activation de certains récepteurs à l'adénosine (Figure 92) (Cattaneo et al., 2014).

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude a été d'évaluer par l'imagerie non invasive de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5, le potentiel effet anti-athérogène et anti-inflammatoire du Ticagrelor et du Prasugrel, chez un modèle de souris ApoE^{-/-} sous régime Paigen.

II.C.2 *Matériel et méthodes*

II.C.2.1 Modèle animal

Toutes les procédures expérimentales ont été acceptées par le comité d'éthique de l'Université Grenoble Alpes (ComEth') et le ministère de la recherche.

Trente-neuf souris ont été nécessaires pour cette étude.

Des souris femelles C57Bl/6j (Charles River) (n=12) âgées de 10 semaines ont été utilisées dans le but de déterminer la posologie du Ticagrelor (BRILIQUE®) et du Prasugrel (EFIENT®) afin d'obtenir des effets similaires sur l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. Les souris ont donc été traitées pendant 5 jours par gavage quotidien de Ticagrelor 180 mg/kg (n=4), de Prasugrel 5 mg/kg (n=4) ou du véhicule (n=4) à l'aide d'une canule de gavage adaptée aux souris (20 G ; Socorex). Ces doses ont été choisies en se basant sur les données de la littérature (Preusch et al. 2016 ; Ohno et al., 2015). Au vu des résultats positifs, ces doses ont été maintenues pour le reste de l'étude.

Des souris femelles ApoE^{-/-} (PHTA, Grenoble) (n=21) âgées de 7 à 9 semaines ont été utilisées afin d'évaluer les effets anti-athérogènes de ces anti-agrégants plaquettaires. Les souris ont été mises sous régime Paigen (1,25% cholestérol, 0,5% acide cholique, 15% de lipides) et réparties aléatoirement en 3 groupes : Contrôle (n=7), Prasugrel (n=7) et Ticagrelor (n=7). Durant 6 semaines, les souris ont été gavées quotidiennement au Ticagrelor (180 mg/kg/jour), au Prasugrel (5 mg/kg/jour) ou à l'eau pour le groupe contrôle (200 µl). Les anti-agrégants étaient dissouts dans l'eau, puis un volume de 200 µl était administré par voie orale une fois par jour, à l'aide d'une canule de gavage de 20G. Des prélèvements sanguins intracardiaques ont été réalisés à la fin de l'étude, après

euthanasie des animaux par inhalation de CO₂ afin de déterminer le taux de cholestérol plasmatique totale. Les souris ont été pesées 1 fois par semaine jusqu'à la fin de l'étude.

II.C.2.2 Validation de la posologie par agrégométrie

Le principe de cette technique est basé sur la mesure de la turbidité d'un milieu à l'aide de l'émission d'un faisceau lumineux, traversant une cuve dans laquelle se trouve la solution d'intérêt. L'enregistrement des variations de turbidité au cours du temps est effectué par une cellule photoélectrique et permet d'évaluer l'effet du Ticagrelor et du Prasugrel sur l'agrégation plaquettaire. Par exemple, en présence d'activateurs de l'agrégation plaquettaire tels que le collagène ou l'ADP, les plaquettes vont changer de conformation, s'agréger, et ainsi laisser passer la lumière (diminution de la turbidité, augmentation du signal lumineux enregistré). On détermine alors sur la courbe 2 paramètres : la vitesse (la pente) et l'amplitude maximale (le pourcentage d'agrégation plaquettaire). Il est nécessaire pour réaliser ces mesures d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes (PPP) pour avoir une mesure du bruit de fond de la turbidité et un plasma riche en plaquettes (PRP) sur lequel l'évaluation de l'agrégation plaquettaire va être réalisée par l'ajout d'agoniste.

Nous avons comparé l'effet sur l'agrégation plaquettaire du Prasugrel (5 mg/kg) et du Ticagrelor (180 mg/kg) afin de déterminer une posologie permettant d'obtenir des effets similaires d'inhibition de l'agrégation plaquettaire.

Des souris C57BL/6J ont été traitées par gavage avec du Ticagrelor (180 mg/kg/jour), du Prasugrel (5 mg/kg/jour) ou de l'eau pour le groupe contrôle durant 5 jours. Après le dernier gavage, les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (80 mg/kg) / xylazine (10 mg/kg). Immédiatement après, 700 µl de sang ont été prélevés par ponction intracardiaque à l'aide d'une seringue (25G) contenant 70 µl d'anti-coagulant (3,8% de citrate de sodium). Le sang des souris de chaque groupe a été regroupé et centrifugé 2 fois à 100 g durant 15 min afin de séparer les plaquettes des autres éléments du sang. A la fin de chaque centrifugation, la phase supérieure contenant les plaquettes a été récupérée à l'aide d'une pipette dans le but d'obtenir un plasma riche en plaquettes (PRP). Une dernière centrifugation a été réalisée à 250 g pendant 10 min et a permis de récupérer du

plasma pauvre en plaquettes (PPP). Ensuite, les plaquettes de la solution PRP ont été comptées et diluées dans leur plasma afin d'obtenir une même concentration en plaquettes entre les différents groupes. L'agrégation plaquettaire maximale a été mesurée en utilisant un agrégomètre à 4 canaux (Apact 4004, Royaume-Unis) après ajout d'un agoniste, l'ADP à 5 μ M (Helena Biosciences, Royaume-Unis). Les mesures ont été effectuées en duplicat pour chaque groupe.

II.C.2.3 Radiomarquage de cAbVCAM1-5 au technétium 99m.

Voir matériels et méthodes (Cf chapitre III.B.1.1, page 223).

II.C.2.4 Imagerie SPECT/CT

Des acquisitions en imagerie SPECT/CT ont été effectuées au temps basal (avant régime et traitement) et au temps final (6 semaines après le début du traitement) pour chaque souris ApoE^{-/-} des 3 groupes servant à l'étude.

Deux heures après l'injection dans une veine latérale de la queue de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 à des doses présentées dans le tableau 5, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (1,5%).

Tableau 5 : Dose injectée de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 par voie intraveineuse aux animaux des groupes contrôles, Ticagrelor et Prasugrel aux différents temps (basal et final). Les activités ont été exprimées en MBq (moyenne \pm écart-type).

	Contrôle	Prasugrel	Ticagrelor
Temps basal	56,3 \pm 9,0	58,7 \pm 6,4	53,2 \pm 11,4
Temps final	54,9 \pm 5,8	54,2 \pm 4,9	56,7 \pm 9,6

Les paramètres d'acquisition de l'imagerie SPECT ont été choisis afin de réaliser des imageries d'une durée comprise entre 41 et 58 min, avec un temps de projection allant de 125 à 175 sec/pj. A la fin de l'imagerie SPECT, une injection d'un produit de contraste (Hexabrix[®]) par voie rétro-orbitale a été effectuée juste avant l'acquisition des images CT (Cf chapitre n°II.A.2.4.1, page 170). Les paramètres d'acquisitions des images aux rayons X ont été les suivantes : 360 projections, 70 kvp et 70 ms par projection pour un temps total d'acquisition de 55 secondes.

A la fin de la procédure d'imagerie, les images SPECT/CT ont été reconstruites et fusionnées à l'aide d'un logiciel dédié (Nucline, Mediso).

II.C.2.4.1 Analyse In vivo

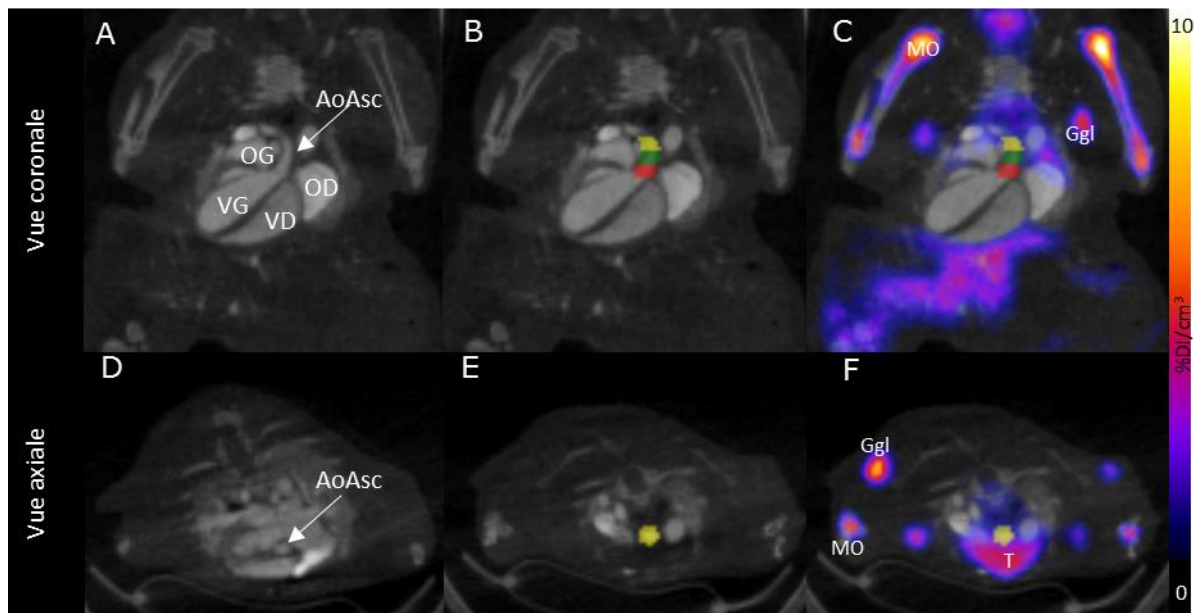


Figure 93 : Images CT (A, B, D, E) et SPECT/CT (C, F) en vue coronale (A, B, C) et en vue axiale (D, E, F) d'une souris ApoE^{-/-} sous régime Paigen, 2h après l'injection de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5. L'acquisition des images aux rayons X après injection d'un produit de contraste a permis de délimiter avec précision des régions d'intérêt, naissant des valves aortiques jusqu'à l'extrémité distale de l'aorte ascendante. Ggl=ganglion, MO = moelle osseuse, T= thymus, OG= oreillette gauche, OD= oreillette droite, VG = ventricule gauche, VD = ventricule droit. Min = 0% DI/cm³, Max = 10% DI/cm³.

Trois régions d'intérêt de 1,3 mm³ ont été placées le long de l'aorte ascendante en se basant uniquement sur les images CT, comme décrit précédemment (Cf chapitre II.A.2.4.1, page 172) (Figure 93). En raison de la fixation thymique importante de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5, nous n'avons pas pris en compte la dernière région d'intérêt. Les quantifications ont été réalisées en prenant la valeur maximale des 2 premières régions d'intérêt et exprimées en % DI/cm³.

II.C.2.5 Analyses ex vivo

Après la procédure d'imagerie SPECT/CT, les souris, toujours anesthésiées, ont été euthanasiées par inhalation de CO₂.

II.C.2.5.1 Biodistribution par prélèvements d'organes

Comme décrit dans les études précédentes (Cf chapitre II.A.2.4.2, page 173), les principaux organes et tissus d'intérêt ont été prélevés, pesés et leur activité mesurée au compteur gamma (Wizard). Les valves aortiques ont été incluses dans de l'OCT (Optimal Cutting Temperature, Tissue-Tek®) puis congelées dans l'isopentane à -40°C afin de réaliser des coupes de 10 µm (immunohistochimie)

et 20 μm (autoradiographie) d'épaisseur au cryostat. La détermination du contenu en lipides des lésions athéromateuses a été réalisée par coloration oil red O des lames adjacentes. Les coupes ont été fixées durant 10 min dans la formaline 10% avant d'être plongées durant 120 min à 60°C dans une solution Oil Red O afin de mettre en évidence les lipides. Un lavage a été réalisé au propylène glycérol 85% pendant 5min.

II.C.2.5.2 *Autoradiographie.*

Les lames dédiées à l'autoradiographie ont été exposées sur un film de phospho-imager pendant 12h. Après lecture au phospho-imager, la fixation de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -cAbVCAM1-5 a été quantifiée en suivant le protocole décrit dans l'étude précédente (Cf. chapitre n° II.A.2.4.2, page 173).

II.C.2.6 *Analyses statistiques*

Les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Un test de Mann -Whitney a été utilisé pour les comparaisons entre le temps basal et final pour chaque groupe. Concernant les comparaisons entre les groupes au temps basal et au temps final, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (ANOVA) a été effectué. Le seuil de significativité a été établie à $P < 0,05$.

II.C.3 Résultats :

II.C.3.1 Validation de la posologie

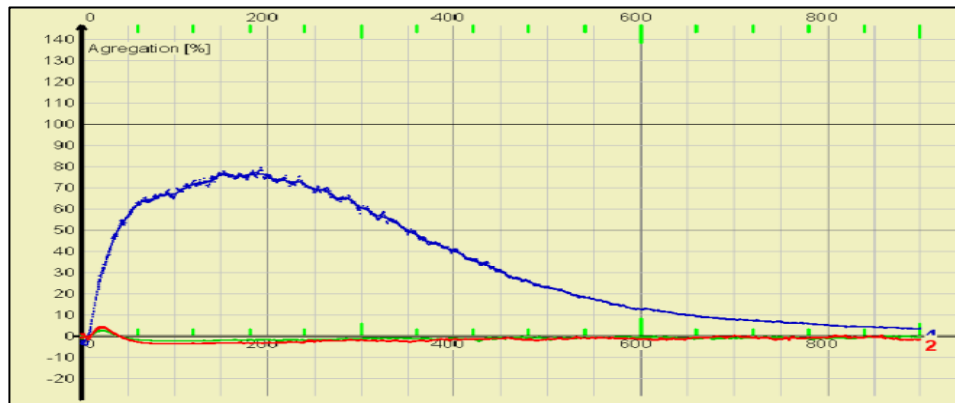


Figure 94 : Taux d'agrégation plaquettaire déterminé par l'agrégomètre 4 canaux automatisés, après activation à l'ADP (5 μ M), sur des échantillons de plasma riches en plaquettes prélevés chez des souris C57Bl/6j 5 jours après un traitement quotidien par gavage au Prasugrel (180 mg/kg) (ligne verte), Ticagrelor (5 mg/kg) (ligne rouge) ou au véhicule (eau) (ligne bleue).

Des souris C57Bl/6j ont été gavées quotidiennement pendant 5 jours au Prasugrel (180 mg/kg), Ticagrelor (5 mg/kg) ou à l'eau (véhicule). L'agrégation plaquettaire a été induite par l'ADP (5 μ M), et a permis de mettre en évidence des effets similaires de ces 2 traitements sur l'agrégation plaquettaire, avec des taux maximums d'agrégation plaquettaire très faibles, de l'ordre de 4% pour le Prasugrel et le Ticagrelor, en comparaison aux 78% du groupe contrôle (Figure 94).

II.C.3.2 Effets du Ticagrelor et du Prasugrel

II.C.3.2.1 Masse corporelle et taux de cholestérol

Tableau 6 : Effets des traitements sur la masse corporelle et le taux de cholestérol plasmatique des souris ApoE^{-/-} au temps basal (avant régime) et au temps final (6 semaines après régime et traitement). Les résultats ont été exprimés en gramme (g) pour la masse corporelle et en g/l pour le taux de cholestérol plasmatique (moyenne \pm écart-type).

Paramètres	Temps	Groupe contrôle	Groupe Prasugrel	Groupe Ticagrelor	Différence
Masse corporelle (g)	Basa	18,6 \pm 2,6	18,6 \pm 1,5	19,1 \pm 2,0	NS, (P=0,75)
	Final	17,8 \pm 1,7	18,1 \pm 1,0	19,3 \pm 2,7	NS, (P= 0,38)
Taux de cholestérol plasmatique total (g/l)	Final	7,4 \pm 2,0	5,6 \pm 0,8	7,1 \pm 1,0	NS, (P=0,12)

Aucune différence de la masse corporelle des souris n'a été observée au temps basal, ou au temps final entre les animaux des 3 groupes (Tableau 6). De plus, au temps final, les taux de cholestérol plasmatique des 3 groupes étaient similaires (Contrôle : 7,4 \pm 2,0 g/l ; Prasugrel : 5,6 \pm 0,8 g/l ; Ticagrelor : 7,1 \pm 1,0 g/l ; P=0,12).

II.C.3.2.2 Caractérisation des lésions athéromateuses

Tableau 7 : Caractérisation des lésions au sein des valves aortiques de souris ApoE^{-/-} sous régime Paigen. La surface des lésions et leur contenu en lipides ont été quantifiés à partir de coupes transversales de valves aortiques, dont des colorations HE et Oil Red O ont été effectuées afin de mettre en évidence le cytoplasme/noyau et la présence de lipides, respectivement. Les résultats ont été exprimés en mm² pour la surface des lésions, et en % de lipides par rapport à la surface totale de plaques (moy ± écart-type).

Paramètres	Groupe contrôle	Groupe Prasugrel	Groupe Ticagrelor	Différence
Surface des lésions (mm ²)	0,15 ± 0,07	0,17 ± 0,09	0,15 ± 0,08	NS
Contenu en lipide (% de lipides par rapport à la surface de plaques)	78,9 ± 31,1	76,5 ± 15,2	86,16 ± 13,0	NS (P=0,81)

La surface des lésions au sein des valves aortiques a été mesurée sur des coupes histologiques sur lesquelles ont été effectuées des colorations HE et Oil Red O (Figure 95). Aucun effet des traitements sur la surface des lésions ou leur contenu en lipides n'a été observé en comparaison au groupe contrôle (Tableau 7).

II.C.3.2.3 Quantification in vivo de la fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 au sein de l'aorte ascendante.

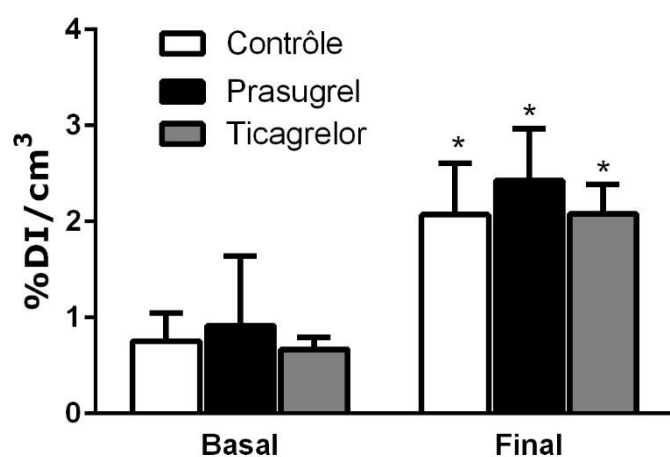


Figure 95 : Quantification SPECT/CT de la fixation au niveau de l'aorte ascendante de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 chez des souris ApoE^{-/-}. Les résultats ont été exprimés en % DI/cm³ (moy ± écart-type). *P<0,05 vs temps basal.

Nous avons pu observer une augmentation significative de la fixation du traceur au temps final par rapport au temps basal que ce soit pour le groupe contrôle (0,75 ± 0,29% DI/cm³ vs 2,07 ± 0,54% DI/cm³), le groupe Prasugrel (0,75 ± 0,24% DI/cm³ vs 2,42 ± 0,54% DI/cm³) ou le groupe

Ticagrelor (0,67 ± 0,13% DI/cm³ vs 2,08 ± 0,30% DI/cm³). En revanche, la fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 a été similaire entre les 3 groupes au temps basal et au temps final (Figure 95).

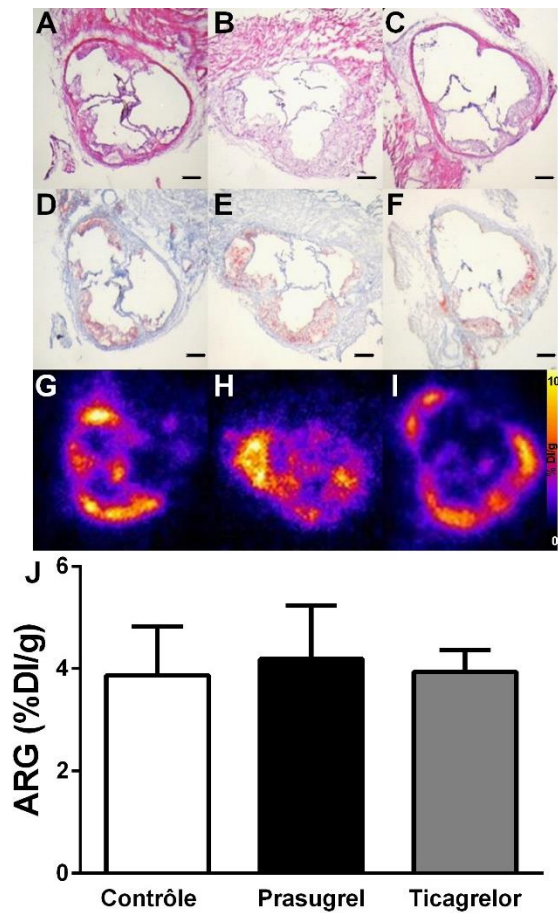
II.C.3.2.4 Quantification ex vivo de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5

II.C.3.2.4.1 Biodistribution par prélèvements d'organes.

Tableau 8 : Biodistribution par prélèvements d'organes, 3h après l'injection de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5. Les résultats ont été exprimés en % DI/g (moy ± écart-type).

	Contrôle	Prasugrel	Ticagrelor
Valves aortiques	2,9 ± 0,8	2,5 ± 0,4	2,6 ± 0,5
Crosse aortique	2,4 ± 0,7	1,9 ± 0,6	2,7 ± 0,7
Aorte abdominale (saine)	0,7 ± 0,4	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2
Cœur	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Foie	3,2 ± 0,7	3,4 ± 0,6	3,1 ± 0,6
Ganglions lymphatiques	11,5 ± 2,7	12,0 ± 2,8	10,3 ± 2,0
Moelle osseuse	11,6 ± 4,1	11,4 ± 3,8	11,5 ± 3,0
Muscle	0,32 ± 0,23	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,2
Poumon	2,9 ± 1,0	3,5 ± 0,8	2,6 ± 0,7
Rate	26,3 ± 3,1	26,7 ± 5,5	22,7 ± 2,2
Rein	282 ± 69	281 ± 80	262 ± 70
Sang	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,2
Thymus	4,1 ± 0,6	4,6 ± 0,9	3,9 ± 0,7
Thyroïde	3,1 ± 1,4	2,6 ± 1,0	1,9 ± 0,5

Comme décrit dans les précédentes études, une fixation importante de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5, déterminée en biodistribution par prélèvements d'organes, a été observée au sein des organes lymphoïdes (moelle osseuse, thymus, ganglions lymphatiques et rate) pour les 3 groupes. Conformément aux quantifications *in vivo* réalisées sur les images SPECT/CT, aucune différence significative de la fixation aortique de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 n'a été observée entre les 3 groupes (Tableau 8). On peut noter une forte fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 dans les valves aortiques et la crosse aortique des souris des 3 groupes par rapport à l'aorte abdominale, qui ne présente pas, ou peu, de lésions athéromateuses. De plus, aucun effet des traitements sur la fixation du traceur n'a été observé dans les autres tissus prélevés.



La fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 mesurée par autoradiographie est en accord avec les données observées en imagerie SPECT/CT et en biodistribution. En effet, la fixation du radiotraceur au sein des plaques d'athérome présentes au niveau des valves aortiques a été comparable entre le groupe Contrôle ($3,9 \pm 1,0\%$ DI/g), le groupe Ticagrelor ($4,0 \pm 0,6\%$ DI/g) et le groupe Prasugrel ($4,2 \pm 1,0\%$ DI/g) ($P=0,826$) (Figure 96).

Figure 96: Images représentatives de coupes transversales de valves aortiques du groupe contrôle (A, D et G), Prasugrel (B, E et H) et Ticagrelor (C, F et I). La fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 a été quantifiée (J) sur les autoradiographies (G, H et I), à partir de régions d'intérêt placées sur les colorations HE (A, B et C). Le contenu en lipides des plaques d'athérome a été déterminé par coloration Oil Red O sur des coupes adjacentes (D, E et F). Barre d'échelle = 200 μm .

II.C.4 Discussion

Le régime Paigen, hypercholestérolémiant, composé de cholestérol et d'acide cholique, a entraîné, chez les souris ApoE^{-/-} des 3 groupes, une augmentation des taux de cholestérol plasmatique, avec des valeurs similaires à celles des taux observés dans l'étude précédente avec les statines (chapitre II.A), mais plus faibles de 38% par rapport à celles des souris du groupe contrôle de l'étude avec l'ézétimibe (chapitre II.B). Le développement des lésions athéromateuses induit par l'hypercholestérolémie a été similaire pour les souris ApoE^{-/-} du groupe contrôle et des groupes traités. En comparaison de l'étude avec l'ézétimibe, la

surface des plaques des souris non traitées a été plus faible, avec une moyenne de 0,16 mm² vs 0,31 mm², en accord avec la réduction du taux de cholestérol observé dans cette dernière étude. En revanche, aucun effet anti-athérogène des inhibiteurs de P2Y₁₂ n'a été observé sur la surface des lésions.

Dans une récente étude, Niu et al. ont suggéré que l'activation du récepteur P2Y₁₂ exprimé par les CMLs serait en partie responsable de leur migration vers l'intima, et ainsi induirait la progression de l'athérosclérose (Niu et al., 2017). Dans cette étude, les auteurs n'ont pas observé d'effet du Clopidogrel à 4 semaines sur la surface des plaques chez des souris ApoE^{-/-}. En revanche, après 12 semaines de traitement, le Clopidogrel a réduit de manière significative la surface des lésions. Cet effet anti-athérogène à long terme pourrait s'expliquer par l'expression plus importante du récepteur P2Y₁₂ par les CMLs au sein des lésions avancées par rapport aux plaques précoces. De plus, une étude publiée en 2015 par Mao Yi et al., a montré un effet anti-athérogène du Ticagrelor sur des lésions athéromateuses avancées, chez des souris ApoE^{-/-} sous régime Western pendant 16 semaines (Mao et al., 2015). Sur la base de ces observations, l'absence d'effet anti-athérogène de l'inhibition pharmacologique du récepteur à l'ADP, P2Y₁₂, observé dans notre étude pourrait être expliqué en partie par la présence de plaques à un stade trop précoce pour observer des effets médiés par l'expression du récepteur P2Y₁₂ au sein des CMLs. Il a en effet été montré que la présence de P2Y₁₂ au sein des lésions athéromateuses était proportionnelle à la surface des lésions (Niu et al., 2017). En analysant les lésions observées dans notre étude, et sur la base de l'étude de Niu et al., il semblerait que ces lésions possèdent une faible quantité de CMLs et donc un faible taux de récepteur P2Y₁₂. Afin de confirmer cette hypothèse, des immunohistochimies ciblant les CMLs et le récepteur P2Y₁₂ vont être réalisées afin d'évaluer de manière semi-quantitative leur présence au sein des lésions athéromateuses.

Malgré leur absence d'effet antiathérogène sur la surface des lésions, les antagonistes au récepteur P2Y₁₂ ont peut-être induit des modifications de l'état inflammatoire des lésions athéromateuses sans pour autant moduler la surface des plaques, comme le suggère l'étude menée par Preuch et al., où les auteurs ont décrit un rôle stabilisateur du Ticagrelor chez la souris ApoE^{-/-}, médié par la

réduction du volume du cœur nécrotique et lipidique sans modification de la surface totale de la plaque (Preusch et al., 2016).

L'évaluation non invasive des effets anti-athérogènes et anti-inflammatoires des antagonistes au récepteur P2Y₁₂ a été réalisée à l'aide de l'agent d'imagerie ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5, dont la sensibilité a été validée dans de précédentes études (Broisat et al., 2014 ; Dumas et al., 2017). Les quantifications des images SPECT/CT de la fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 ont confirmé que le régime Paigen, pro-athérogène, avait bien induit une augmentation de l'expression de VCAM-1 au sein des lésions athéromateuses, avec une fixation aortique deux fois plus élevée, en comparaison aux quantifications réalisées au temps basal. Cette fixation a été similaire à celle observée dans l'étude avec l'ézétimibe pour le groupe non traité. En revanche, aucun effet des traitements n'a été observé sur la fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5. Ces résultats ont été confirmés par les quantifications *ex-vivo* en biodistribution par prélèvements d'organes et en autoradiographie au sein des valves aortiques.

L'inactivation des plaquettes par le Ticagrelor ou le Prasugrel n'a pas eu d'effet anti-inflammatoire au sein des lésions athéromateuses. En effet, nous n'avons pas observé de réduction de l'expression de marqueurs de l'inflammation tels que la protéine d'adhésion cellulaire VCAM-1. Ces résultats sont en contradiction avec les données de la littérature qui présentent une réduction des médiateurs de l'inflammation médiée par l'inactivation des plaquettes (Nylander et Schulz., 2016). En effet, Totani et al. ont observé, chez un modèle de souris présentant une inflammation aiguë (choc septique) et traitées avec le Prasugrel, une réduction de TNF- α et de l'interaction plaquettes/PNN (Totani et al., 2012). Chez l'homme, des effets similaires ont également été observés chez des patients coronariens traités avec des inhibiteurs du récepteur P2Y₁₂. Heitzer et al. ont montré chez des patients ayant été victimes d'un SCA et traités sous Clopidogrel, une réduction des marqueurs de l'inflammation circulants (hsCRP, RANTES et sCD40L) (Heitzer et al., 2006). Ces résultats ont été confirmés par de nombreuses études (Adamski et al., 2014). Le régime Paigen, pro-athérogène, utilisé dans cette étude pourrait être en partie responsable de ces observations contradictoires. Celui-ci entraîne une inflammation systémique importante, dépendante de l'association du cholestérol et de l'acide cholique (Vergnes et al., 2003), dont nous avons inhibé l'effet chez des souris traitées à l'ézétimibe. Il est

possible que les effets anti-inflammatoires du Ticagrelor et du Prasugrel n'aient pas compensé ceux induits par le régime Paigen.

Enfin, l'absence d'effets anti-inflammatoires par le Ticagrelor est également surprenante. En plus de son effet lié à l'inactivation du récepteur P2Y₁₂, le Ticagrelor possède des effets pléiotropes médiés par l'inhibition du transporteur aux nucléosides (ENT1) (Armstrong et al., 2014). Celui-ci est exprimé à la surface des érythrocytes mais également des plaquettes (Aungraheeta et al., 2016), et son inhibition entraîne une augmentation de la concentration plasmatique en adénosine chez les patients traités au Ticagrelor (Bonello et al. 2014), provoquant l'activation de récepteurs à l'adénosine connus pour avoir des effets variés sur l'athérogenèse et l'inflammation (Haskó et al., 2008). Des études ont montré que l'activation du récepteur A_{2A} inhibait la formation de cellules spumeuses (Bingham et al., 2010), tandis que la délétion du récepteur à l'adénosine A₁ chez un modèle de souris ApoE^{-/-} aurait des effets anti-athérogènes médiés par la diminution de cytokines pro-inflammatoires (Teng et al., 2014). De plus, un essai clinique randomisé récent (HI-TECH) portant sur l'évaluation de l'effet pléiotrope du Ticagrelor sur la fonction endothéliale, n'a pas démontré d'effet bénéfique supplémentaire en comparaison du Prasugrel et du Clopidogrel chez des patients post-SCA (Ariotti et al., 2018). Le dosage de l'adénosine plasmatique aurait été une mesure pertinente dans l'évaluation des effets du Ticagrelor sur le transporteur ENT1, mais sa demi-vie étant très courte (<10 sec), sa quantification en était d'autant plus complexe.

Le potentiel effet anti-athérogène des inhibiteurs au récepteur P2Y₁₂ médié par leurs mécanismes anti-inflammatoires n'a pas été confirmé dans notre modèle d'étude. Le régime pro-athérogène et pro-inflammatoire utilisé afin d'induire la formation de lésions athéromateuses peut en partie expliquer l'absence d'effets observables *in vivo* et *ex vivo*.

II.D Evaluation de la biodistribution de cAbVCAM1-5 couplé à un fluorochrome

II.D.1 *Objectif*

La plaque d'athérome est un élément complexe, caractérisé par l'infiltration de nombreux types cellulaires permettant de définir en partie les différents stades de développement de la pathologie. En effet, au stade initial, les lésions athéromateuses sont composées essentiellement de monocytes/macrophages évoluant en cellules spumeuses par l'internalisation des LDLox, tandis qu'au stade avancé, celles-ci vont être constituées de nombreuses cellules de l'immunité (LT, LB, CDs, Mastocytes, ...) et de CMLs. Certaines de ces cellules expriment à leur surface différents marqueurs protéiques reflétant l'état inflammatoire des lésions, et par conséquent permettant d'évaluer leur caractère vulnérable. Parmi ces marqueurs, VCAM-1 dont l'expression au sein des lésions athéromateuses humaines a été associée à la vulnérabilité de la plaque, est initialement exprimé par les CEs activées, présentes dans la lumière des vaisseaux. Cependant, l'expression de VCAM-1 n'est pas restreinte aux CEs. En effet, des études ont montré que cette protéine était également exprimée par les CMLs, les macrophages et les CEs des néovaisseaux, localisés en périphérie et au sein des lésions athéromateuses (O'Brien et al., 1993 ; Davies et al., 1993).

Différents points restent à être clarifier quant à la fixation cellulaire et subcellulaire de cAbVCAM1-5 au sein des lésions athéromateuses. Premièrement, de savoir si ce nanobody pénètre au sein des lésions athéromateuses. Si oui, sur quels types cellulaires celui-ci se lie-t-il ? Et jusqu'où peut-il atteindre sa cible au sein des lésions (périphérie, centre) ?

Afin de répondre à ces questions, seule la microscopie par fluorescence peut nous apporter la résolution suffisante pour évaluer la fixation cellulaire et subcellulaire de cAbVCAM1-5. Pour ce faire, ce nanobody a été conjugué à un fluorochrome. Différentes méthodes de complexation d'un fluorochrome à une protéine recombinante existent, et ont des effets variés sur la pharmacocinétique et la fonctionnalité de la molécule, comme cela a pu être démontré par l'équipe du laboratoire de l'université de Bruxelles (ICMI) (Debie et al., 2017). Sur la base des résultats de cette étude, la méthode de conjugaison "site spécifique" sur un résidu cystéine a été choisie.

Dans cette optique, nous avons dans un premier temps évalué l'effet d'un tel couplage sur la pharmacocinétique de cAbVCAM1-5, en comparaison de son radiomarquage au ^{99m}Tc . Une étude de faisabilité a été menée chez des souris ApoE^{-/-} afin d'évaluer sa fonctionnalité et sa spécificité, une fois conjugué à un fluorochrome. L'objectif final étant bien entendu d'évaluer la fixation cellulaire et subcellulaire de cAbVCAM1-5 au sein de lésions athéromateuses, celui-ci a été couplé à un fluorochrome émettant dans le proche infrarouge (CW800) afin de s'affranchir de l'autofluorescence importante au sein des plaques (collagène, élastine, LDLox et cristaux de cholestérols) (Gaffney et al., 1989).

II.D.2 *Matériels et méthodes*

II.D.2.1 *Modèle animal*

Des souris femelles (n=12) ApoE^{-/-} âgées de 35 semaines, nourries sous régime Western pendant 20 semaines et 7 souris femelles C57Bl/6J sous régime standard âgées de 15 semaines ont été utilisées dans cette étude.

Des solutions de cAbVCAM1-5/800CW ou de RR23/800CW (nanobody contrôle) à 2 nM ont été injectées par voie intraveineuse chez des souris vigiles.

Trois heures après l'injection du nanobody, les souris ont été euthanasiées par inhalation de CO₂. Les organes d'intérêt tels que la rate, le thymus, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, le muscle, le cœur mais également l'aorte ont été prélevés dans les plus brefs délais.

II.D.2.2 *Imagerie par fluorescence de cAbVCAM1-5 (Fluobeam 800)*

La détection de la fluorescence dans le proche infrarouge a été réalisée à l'aide de la sonde FB800 (Fluoptics) (excitation : 780 nm, émission : 800 nm). Les images ont été réalisées avec un temps d'exposition fixé à 200 ms.

II.D.2.3 *Analyse des images*

La quantification des images de fluorescence a été effectuée en mesurant la valeur moyenne d'intensité de fluorescence au sein de chaque région d'intérêt délimitée à l'aide du logiciel ImageJ. Dans le but de mesurer la fixation de cAbVCAM1-5, localisé dans les plaques d'athérome, ces régions d'intérêt ont été délimitées au niveau de la crosse aortique, zone dans laquelle se développent

préférentiellement les lésions athéromateuses chez des souris ApoE^{-/-}. Les résultats ont été exprimés en intensité relative et ont été normalisés de l'intensité moyenne mesurée avec le nanobody contrôle RR23/800CW chez les souris ApoE^{-/-} pour chaque tissu. La fluorescence étant dépendante de la couleur (l'absorption) de l'organe, nous n'avons pas pu comparer directement les organes entre eux. En effet, la rate, organe de couleur sombre, présente une forte atténuation du signal en comparaison du thymus ou des ganglions lymphatiques, plus clairs.

II.D.2.4 Analyses statistiques

Les données ont été exprimées en moyenne \pm écart-type. Un test Anova a été réalisé afin de comparer les valeurs relatives d'intensité de fluorescence pour chaque tissu entre les 3 groupes. Le seuil de significativité a été fixé à 5% ($P < 0,05$).

II.D.3 Résultats

Le couplage à un fluorochrome émettant dans le proche infrarouge n'a pas modifié la biodistribution de cAbVCAM1-5 (Figure 97). En effet, nous avons observé une intensité de fluorescence significativement plus importante de cAbVCAM1-5 dans la rate, le thymus, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques des souris C57BL/6J et ApoE^{-/-} en comparaison des souris injectées avec le nanobody contrôle (RR23/800CW). Au sein des lésions athéromateuses (crosse aortique) des souris ApoE^{-/-}, une intensité de fluorescence significativement plus importante a été mesurée pour le groupe cAbVCAM1-5/800CW en comparaison du groupe cAbVCAM1-5/800CW chez des souris C57BL/6J et du groupe contrôle (RR23/ApoE^{-/-}). Conformément à la biodistribution de cAbVCAM1-5 radiomarké au ^{99m}Tc, nous n'avons pas observé de différence dans l'intensité de fluorescence entre les 3 groupes dans le muscle squelettique. En revanche, nous avons observé, pour le myocarde, une augmentation significative de la fixation de cAbVCAM1-5 chez les souris ApoE^{-/-} et C57BL/6J en comparaison du groupe contrôle ($P < 0,05$). Il est également à noter que nous avons observé une fixation hépatique importante du nanobody, reflet d'une élimination importante par le foie, que l'on ne retrouve pas lorsque celui-ci est radiomarké au ^{99m}Tc.

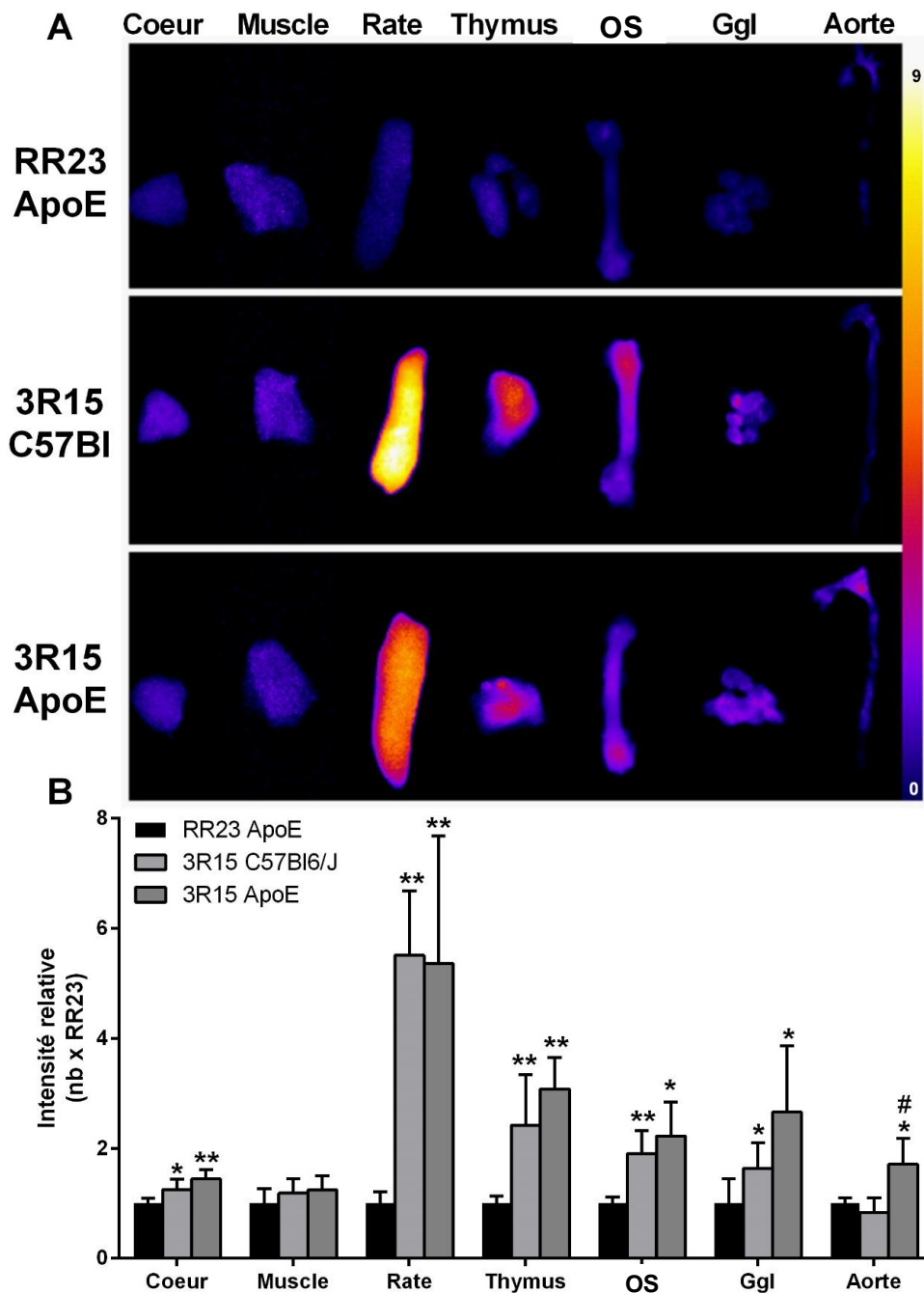


Figure 97 : Evaluation de la biodistribution de cAbVCAM1-5 couplé à un fluorochrome chez des souris ApoE^{-/-} et C57BL/6j. Images représentatives de la fixation de cAbVCAM1-5/800CW et RR23/800CW dans différents organes prélevés chez des souris C57BL/6J et ApoE^{-/-} (A). Quantification de la fluorescence normalisée de l'intensité moyenne de RR23 chez la souris ApoE^{-/-} (B). * P<0.05 **P<0.01 vs RR23 ApoE^{-/-}, #<0.05 vs 3r15 C57BL/6J. Ggl= Ganglions lymphatiques.

II.D.4 *Discussion*

Ces premiers résultats sont encourageants. La méthode de marquage site-spécifique sur un résidu cystéine n'a pas engendré de modification majeure de la biodistribution de cAbVCAM1-5 en comparaison de sa pharmacocinétique lorsqu'il est radiomarqué au ^{99m}Tc , hormis son élimination hépatique importante. L'émission dans le proche infrarouge nous a permis, à l'échelle macroscopique, via la sonde fluobeam 800, de détecter et de quantifier la fixation de celui-ci. En effet, au sein des organes lymphoïdes exprimant VCAM-1, sa fixation a toujours été significativement supérieure, que ce soit chez les souris ApoE^{-/-} ou C57BL/6J en comparaison de celle observée avec le nanobody contrôle chez des souris ApoE^{-/-}. De plus, une augmentation significative de l'intensité de fluorescence de cAbVCAM1-5/800CW a été observée au sein de la crosse aortique des souris ApoE^{-/-}, présentant des lésions athéromateuses importantes, en comparaison des segments de crosse aortique saine des souris C57BL/6J. Cette fixation de cAbVCAM1-5 dans la crosse aortique était significativement plus importante que celle du nanobody contrôle, confirmant la spécificité de cette fixation.

Nous avons validé dans cette étude que l'ajout d'un fluorochrome par liaison sur la cystéine terminale de cAbVCAM1-5 ne modifiait pas sa liaison à VCAM-1 chez la souris, permettant d'envisager son utilisation dans l'évaluation de sa fixation cellulaire et subcellulaire au sein de lésions athéromateuses. Deux possibilités sont à l'étude afin de répondre à cet objectif. La première serait d'utiliser ce même nanobody couplé avec un fluorochrome émettant dans le proche infrarouge (IR 800), tout en sachant que ce spectre d'émission n'est pas adapté aux microscopes à fluorescence actuels. Les premiers tests effectués n'ont pas été concluants, et nous attendons de réaliser de nouveaux essais sur un nouvel équipement de dernière génération. La deuxième solution serait de modifier le fluorochrome, par exemple émettant dans la longueur d'onde de 680 nm, tout en conservant la méthode de conjugaison site spécifique sur un résidu cystéine afin d'avoir un outil plus adapté aux microscopes à fluorescence actuels.

L'objectif de ma thèse portant sur l'étude de la fixation cellulaire et subcellulaire de cAbVCAM1-5 n'est pour l'instant pas atteint, mais une avancée certaine a été effectuée, puisque nous avons pu valider la méthode de conjugaison à un fluorochrome.

II.E Evaluation de l'effet de cAbVCAM1-5 sur l'interaction entre VLA-4 et VCAM-1

II.E.1 *Objectif*

L'embryogenèse, le recrutement des leucocytes au site de l'inflammation et l'hématopoïèse extra-médullaire au sein des organes lymphoïdes secondaires sont des processus hautement régulés. Les intégrines, les CAMs et les cytokines jouent un rôle essentiel dans ces mécanismes de régulation. VCAM-1 et son ligand naturel l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) font partie des protéines participant aux interactions cellules-cellules, indispensable à ces processus. En effet, la délétion du gène codant pour la protéine d'adhésion cellulaire VCAM-1 est létale chez la souris durant l'embryogenèse (Kwee et al., 1995), la délétion de son domaine 4, interagissant avec VLA-4, chez un modèle de souris ApoE^{-/-} induit des effets anti-athérogènes notables médiés par l'inhibition de l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire (Dansky et al., 2001). De plus, son expression par les macrophages spléniques est essentielle à la prolifération des cellules souches hématopoïétiques durant l'hématopoïèse extra-médullaire (Dutta et al., 2015). Il en est de même pour la délétion ou l'inhibition de son ligand, l'intégrine $\alpha 4\beta 1$. En effet, la délétion de la sous-unité $\beta 1$ ou $\alpha 4$ est létale chez la souris au stade embryonnaire (Fässler et Meyer, 1995 ; Yang, Rayburn, et Hynes, 1995), tandis que son inhibition par le Natalizumab (anticorps monoclonal anti $\alpha 4\beta 1$) est utilisée dans le traitement des formes très actives de sclérose en plaques (Polman et al., 2006).

Dans le cadre du transfert clinique de cAbVCAM1-5, celui-ci sera injecté à l'état de trace (de l'ordre de 50 μ g par patient). Qu'il soit ou non compétiteur de VLA-4, un effet pharmacologique de la molécule est peu probable. Cependant, afin de bien la caractériser, il nous a paru important d'élucider ce point, notamment pour déterminer si elle peut avoir d'autres applications à plus forte dose.

Dans le but d'étudier l'effet de la fixation de cAbVCAM1-5 sur l'interaction entre l'intégrine VLA-4 exprimée par les cellules Jurkat (lymphocytes T) et VCAM-1, exprimée par les cellules endothéliales bEnd5 stimulées au TNF- α , une étude préliminaire a été réalisée visant à évaluer l'adhésion des LT (Jurkat) sur des cellules endothéliales activées. Pour rappel, les LT expriment de manière constitutive l'intégrine $\alpha 4\beta 1$. Celle-ci peut être soit dans un état de faible affinité,

en présence de CaCl_2 MgCl_2 , soit dans une conformation permettant une forte affinité pour son ligand (VCAM-1) lorsque les cellules sont dans un tampon contenant du MnCl_2 . VCAM-1 est quant à elle exprimée par les bEnd5 stimulées au TNF- α . Différents nanobodies ont été utilisés afin d'évaluer leurs interactions avec la liaison VLA-4/VCAM-1. En effet, lors du développement de cAbVCAM1-5, plusieurs nanobodies dirigés contre VCAM-1 avaient été produits et évalués (Broisat et al., 2012). Par la technique de SPR (Cf chapitre n° III.B.4.1, page 230), ces nanobodies avaient été classés en 3 familles, selon leurs épitopes de reconnaissance.

Dans cette étude, 1 ou 2 nanobodies provenant de chaque famille ont été utilisés (cAbVCAM1-5/U3607, U4301 et U4303) ainsi qu'un nanobody non spécifique (cAbBcII10), et un anticorps commercial (IgG_{2a}, clone 429, BD Pharmingen) dirigé contre VCAM-1, dont la fixation est connue pour inhiber partiellement la liaison à VLA-4.

II.E.2 *Matériels et méthodes*

II.E.2.1 Culture cellulaire

Une lignée cellulaire endothéliale dérivée de cerveau de souris (ECACC, Salisbury, UK, #96091930) bEnd5 a été cultivée dans un milieu complet DMEM stérile supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium, 1% de Pénicilline-Streptomycine, à 37°C dans un incubateur humidifié avec 5% de CO_2 .

Une deuxième lignée cellulaire lymphocytaire T provenant d'un patient atteint d'une leucémie aiguë lymphoblastique T (ATCC, USA) et exprimant VLA-4 a été utilisée. Ces cellules non adhérentes ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 contenant 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium, 1% de Pénicilline/Streptomycine, à 37°C dans un incubateur humidifié avec 5% de CO_2 .

II.E.2.2 Radiomarquage au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ des cellules Jurkat :

Le radiomarquage au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ des lymphocytes T a été réalisé à l'aide du kit commerciale Exametazime, appelé également HMPAO (hexamethylpropyleneamine oxime) (Cerotec, GE Healthcare). Brièvement, le kit

HMPAO a été incubé pendant 1 min en présence d'ions pertechnétate, TcO_4^- . Puis, environ 230 MBq ont été prélevés et incubés avec $25 \cdot 10^6$ cellules (Jurkat) pendant 15 min à température ambiante. Enfin, 2 centrifugations de 5 min à 800 rpm ont été réalisées afin d'éliminer le ^{99m}Tc libre.

II.E.2.3 Test d'adhésion cellulaire (cellules à cellules)

Après radiomarquage des cellules Jurkat au ^{99m}Tc , le culot cellulaire a été resuspendu dans du tampon TBS contenant soit 1 mM de $CaCl_2MgCl_2$ (inactivation de VLA-4), soit 1 mM de $MnCl_2$ (activation de l'intégrine VLA-4).

Les bEnd5 ont été déposées dans une plaque-96 puits à $25 \cdot 10^4$ cellules/puits pendant 18h en présence ou en absence de 50 ng/ml de Tumor Necrosis Factor-alpha recombinant humain (TNF- α , Peprotec, France), permettant d'induire l'expression de VCAM-1. Le milieu de culture a été retiré et $5 \cdot 10^4$ cellules ont été déposées pendant 30 min à 37°C dans les puits contenant les cellules endothéliales en présence soit de cAbVCAM1-5 à 100 nM, de cAbBcII10 (nanobody contrôle) à 100 nM, de U3607 à 100 nM, de U4301 à 100 nM, de U4303 à 100 nM et d'anticorps de rat anti-CD-106 murin à 10 nM (clone 429, BD Pharmigen, USA). Trois lavages consécutifs avec 200 μ l de tampon TBS $CaCl_2MgCl_2$ ou TBS $MnCl_2$ ont permis d'éliminer l'activité non spécifique. Enfin, l'activité spécifique (^{99m}Tc -jurkat liées aux cellules endothéliales) a été mesurée au compteur gamma (Wizard, PerkinElmer) après lyse des cellules en présence d'une solution de NaOH à 1 M. Ce protocole a été mis au point à partir de celui développé par l'équipe de Gao et al. en 1996 (Gao et Issekutz, 1996).

II.E.2.4 Analyse des résultats

L'expérience a été réalisée en triplicat. L'activité a été corrigée du bruit de fond et de la décroissance radioactive. Les résultats ont été normalisés de la condition contrôle (Jurkat activées, bEnd5 stimulées) et exprimés sous la forme d'un pourcentage d'adhésion des cellules Jurkat suivant la formule suivante :

$$\frac{\text{Activité condition testée}}{\text{Activité condition Jurkat seules (CPM)}} \times 10$$

Les données ont été exprimées en moyenne \pm écart-type. Un test post hoc ANOVA à un facteur, le test de Dunnett (test de comparaisons multiples), a été réalisé afin de comparer les conditions testées à celles de la condition bEnd5 stimulées/Jurkat stimulées seules. Le seuil de significativité a été fixé à 5% ($P < 0,05$).

II.E.3 Résultats :

Comme le montrent les résultats de la figure 98, nous avons observé une faible fixation des Jurkat- ^{99m}Tc activées sur les cellules endothéliales non stimulées ($12,1 \pm 5,9 \%$).

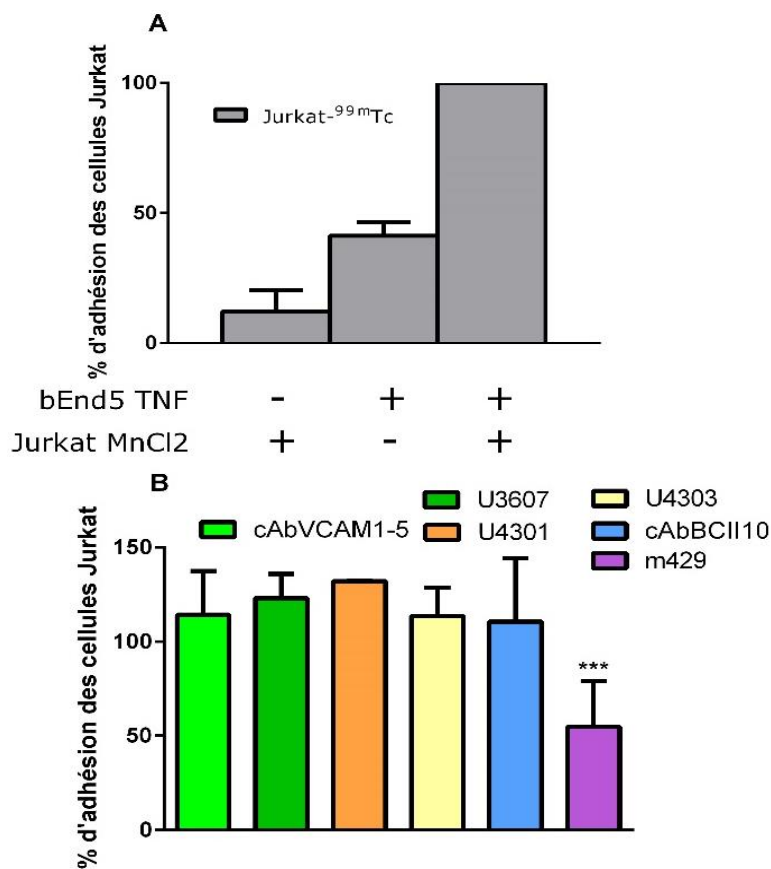


Figure 98 : Effet des nanobodies sur l'interaction entre VLA-4 et VCAM-1. Des cellules endothéliales bEnd5 ont été cultivées à confluence dans une plaque-96 puits, incubées ou non en présence de TNF- α (50 ng/ml) pendant 18h. Après stimulation des bEnd5, des lymphocytes T radiomarqués au ^{99m}Tc ont été stimulés ou non en présence de MnCl2 afin d'activer l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ et déposés ($2 \cdot 10^5$ cellules/puits) durant 30 min à 37°C (A). L'effet des différents nanobodies (cAbVCAM1-5, U3607, U4301, U4303 et cAbBCII10) et d'un anticorps m429 sur l'interaction entre VCAM-1 (bEnd5) et VLA-4 (Jurkat) a été étudiée en les incubant à une concentration de 100 nM en présence de lymphocytes T stimulés radiomarqués au ^{99m}Tc pendant 30 min à 37°C sur les cellules endothéliales stimulées au TNF- α . Les résultats ont été normalisés de la condition Jurkat seules (B).

Le traitement des cellules endothéliales (bEnd5) au TNF- α a augmenté la fixation des Jurkat- ^{99m}Tc non activées d'environ 3,4 fois ($41,3 \pm 3,7\%$) par rapport à la condition bEnd5 non stimulées. Enfin, dans la condition où les bEnd5 et les Jurkat ont été stimulées, l'adhésion des Jurkat- ^{99m}Tc a augmenté d'environ 2,4

fois par rapport à la condition expérimentale précédente et d'environ 8 fois par rapport à la 1^{ère} condition (bEnd5 non stimulées, Jurkat activées). L'adhésion des LT sur les cellules endothéliales via l'interaction VLA-4/VCAM-1 a été validée par l'incubation d'un anticorps anti VCAM-1, dont la fixation est connue pour inhiber partiellement la liaison VCAM-1/VLA-4. En effet, en sa présence, nous avons observé une diminution de l'adhésion des Jurkat-^{99m}Tc d'environ 1,8 fois par rapport à la condition Jurkat seules.

Après validation des conditions expérimentales (Figure 98-A), l'interaction des différents nanobodies sur la liaison VLA-4/VCAM-1 a pu être évaluée suivant le même protocole (Figure 98-B). Nous n'avons pas observé d'effet significatif des nanobodies sur l'adhésion des lymphocytes T aux cellules endothéliales. Les 3 épitopes sur lesquels se fixent ces molécules n'empêchent pas l'interaction entre VCAM-1 et VLA-4.

Ces résultats suggèrent que cAbVCAM1-5, pas plus que les autres nanobodies anti VCAM-1 étudiés, ne se lie sur l'un des deux domaines (1 ou 4) nécessaires à la liaison de VLA-4 sur VCAM-1 (Chuluyan et al., 1995).

II.F Conclusion Partie I

L'imagerie non invasive des plaques d'athérome impliquées dans la maladie coronaire est devenue ces dernières années un enjeu capital pour le diagnostic et le suivi des patients atteints de maladies cardiovasculaires. Malgré les progrès réalisés dans le diagnostic de cette maladie, seul 1/3 des plaques responsables des évènements aigus sont détectables à l'heure actuelle par angiographie. L'un des objectifs du laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques est la mise au point d'un traceur permettant la détection non invasive de ces plaques vulnérables grâce à l'élaboration d'un radiotracer couplé au technétium-99m dirigée contre VCAM-1. L'objectif de cette première partie de thèse était de finaliser le développement préclinique de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$.

D'une part, nous avons évalué la sensibilité de cAbVCAM1-5 pour l'imagerie de l'expression de VCAM-1 au sein des lésions athéromateuses, en testant l'effet d'un traitement de référence (l'atorvastatine) chez un modèle de souris ApoE^{-/-} sous régime Western pendant 20 semaines. L'imagerie de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ a permis de suivre avec succès l'effet anti-athérogène des statines. La quantification *in vivo* (par imagerie SEPCT) de la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ dans des lésions aortiques a été très fortement corrélée à celle effectuée *ex vivo* et à l'expression de VCAM-1. Ces résultats sont encourageants pour le transfert en clinique de cAbVCAM1-5, mais la durée de l'étude constitue une limite importante dans la perspective d'évaluer de nouvelles thérapies anti-athérogènes en préclinique.

C'est pour répondre à cette problématique que nous avons évalué la sensibilité de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ en testant l'effet d'un traitement de référence (l'ézétimibe), dans une seconde étude, sur un modèle de souris ApoE^{-/-} sous régime Paigen, dont l'ajout d'acide cholique augmente l'absorption de cholestérol et permet donc d'induire plus rapidement la formation de lésions athéromateuses. Seulement 6 semaines d'étude auront été nécessaires pour évaluer *in vivo*, l'effet anti-athérogène de l'ézétimibe au niveau de l'aorte ascendante. De plus, des mesures quantitatives de l'expression de VCAM-1 par dosage ELISA ont permis de confirmer la sensibilité de fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ à l'expression de sa cible.

A partir de ce modèle d'étude, nous avons pu évaluer l'effet anti-athérogène et anti-inflammatoire de nouvelles thérapies. Deux antagonistes du récepteur P2Y₁₂ connus pour leur effet antiplaquettaire ont été évalués. Les résultats de cette étude nous ont permis de conclure en l'absence d'effet anti-inflammatoire et anti-athérogène du Ticagrelor et du Prasugrel chez des souris ApoE^{-/-} sous régime Paigen.

D'autre part, nous avons validé la méthode de conjugaison de cAbVCAM1-5 à un fluorochrome, par liaison site-spécifique à un résidu cystéine afin de réaliser ultérieurement l'évaluation de la fixation cellulaire et subcellulaire de celui-ci. Enfin, nous avons confirmé que la fixation de cAbVCAM1-5 n'entraînait pas d'inhibition de l'interaction entre VCAM-1 et son contre-récepteur, l'intégrine $\alpha 4\beta 1$.

En conclusion, la finalisation de la caractérisation préclinique de cAbVCAM1-5 permet de disposer de données essentielles en vue de son transfert vers la clinique dans le cadre du projet MC² ("Molecular imaging of coronary lesions in clinical practice"), sélectionné lors de l'appel à projet PRTS (programme de recherche translationnelle en santé) 2013.

III PARTIE II : TRANSFERT CLINIQUE

III.A Objectif

Dans le contexte réglementaire strict d'un transfert clinique de molécules biotechnologiques, la production de cAbVCAM1-5 doit être effectuée selon les normes BPF, imposées par l'EMA et l'ANSM afin de garantir la sécurité et l'efficacité d'administration du produit. Le transfert en clinique de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 nécessite donc que le nanobody anti-VCAM-1 soit produit selon les spécifications BPF, tout comme l'intermédiaire de radiomarquage, nécessaire à son couplage au ^{99m}Tc . La production de cAbVCAM1-5 a donc été sous-traitée à une entreprise certifiée pour la production de produits biotechnologiques aux normes BPF, Px therapeutics et l'intermédiaire de radiomarquage a été produit par ERAS labo. Enfin, la méthode de radiomarquage doit également être optimisée afin de faciliter son transfert en clinique et de répondre aux normes des bonnes pratiques de préparation.

L'objectif de cette deuxième partie de thèse était donc de valider par des études biologiques (*in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*) la production de l'intermédiaire tricarbonyl aux BPF et les modifications apportées aux protocoles de radiomarquage ainsi que les différents lots de cAbVCAM1-5 nécessaires à la validation du lot final produit aux BPF. D'autre part, des études visant à optimiser la dosimétrie ont également été menées.

III.B Matériels et méthodes :

III.B.1 *Optimisation du radiomarquage de cAbVCAM1-5 au ^{99m}Tc et de l'intermédiaire de réaction tricarbonyl produit aux normes BPF*

III.B.1.1 Description de la méthode initiale de radiomarquage

La méthode de marquage initiale du nanobody cAbVCAM1-5 au ^{99m}Tc consiste à lier le radioélément à la queue polyhistidine (6HIS) en position C-terminal de la protéine via la méthode tricarbonyl. Cette méthode nécessite deux étapes.

Une première étape consiste à former le précurseur Tc-tricarbylone ($[^{99m}\text{Tc}-(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$) via le kit commercial Isolink[®] (PSI-Suisse). Au cours de la seconde étape le précurseur ainsi formé échange rapidement ses molécules d'eau pour se complexer au Tag-histidine (ligand donneur d'électrons) (Figure 99). Brièvement, 1 ml de $[^{99m}\text{Tc}]$ -pertechnétate (0,74–3 GBq) est incubé avec le kit pendant 20 min à 95°C pour former le précurseur Tc-tricarbylone. Après neutralisation, 500 µl du précurseur sont ajoutés à 50 µg d'une solution cAbVCAM1-5 (1 mg/ml) (Figure 99). La solution est incubée pendant 90 min à 50°C et ensuite purifiée sur une colonne Sephadex G25 (NAP-5 ; GE Healthcare) avec du PBS avant d'être passée sur un filtre 0,22 µm Millex (Millipore, Bedford, MA).

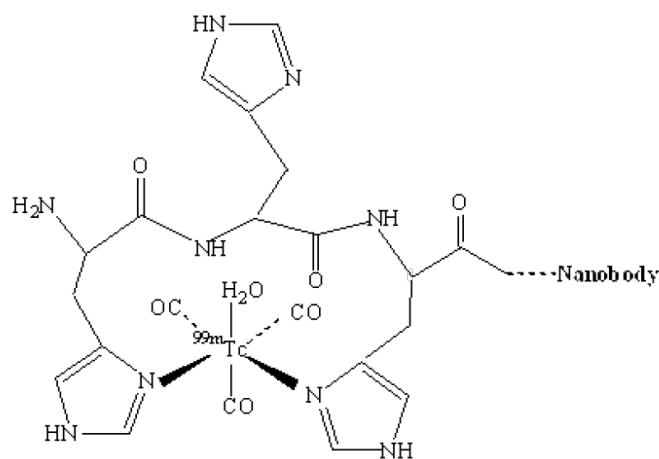


Figure 99 : Radiomarquage au ^{99m}Tc sur les résidus histidines utilisant la méthode tricarbonyle initiale.

Dans le but de faciliter son transfert en clinique, des optimisations de cette méthode de radiomarquage ont été développées et évaluées.

III.B.1.2 Paramètres évalués

III.B.1.2.1 Température

Une première approche a visé à réduire le temps de complexation de cAbVCAM1-5 avec le précurseur ^{99m}Tc -tricarbonylone en augmentant la température de réaction, permettant de réduire le temps d'incubation de 45 min. D'une température initiale de réaction de 50°C, nous sommes passés à 75°C. Au préalable, la stabilité thermique du nanobody avait été déterminée (par dichroïsme circulaire à l'aide d'un spectropolarimètre) comme étant supérieure à 90°C.

III.B.1.2.2 *Masse*

L'injection chez l'homme implique également d'effectuer des modifications dans la quantité de cAbVCAM1-5 utilisée lors du radiomarquage. En effet, les doses prévues chez l'homme ont été estimées en se basant sur la dosimétrie réalisée avec le ^{99m}Tc -DMSA (acide dimercaptosuccénique), puisque la biodistribution de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 a mis en évidence chez le petit animal une forte rétention de celui-ci dans le cortex rénal. La dose efficace a été déterminée pour un patient de 70 Kg entre 3,3 et 4,8 mSv pour une activité injectée entre 370 MBq et 550 MBq. Les quantités de cAbVCAM1-5 injectées chez l'homme seront comprises entre 50 et 75 μg . Par conséquent, nous avons étudié l'effet d'une augmentation de la quantité de cAbVCAM1-5 radiomarké, passant de 50 à 100 μg .

III.B.1.2.3 *Méthode "1 étape"*

Afin de réduire le nombre de manipulations dans l'optique d'un radiomarquage de cAbVCAM1-5 en routine chez l'homme, un protocole de radiomarquage en une seule étape a été évalué.

1 ml de [^{99m}Tc]-pertechnétate (0,74–3 GBq), 100 μg d'une solution cAbVCAM1-5b (1 mg/ml) et un volume adapté d'Acide chlorhydrique (agent neutralisant) sont ajoutés au kit Isolink[®]. La solution est incubée en une seule étape pendant 45 min à 75°C et ensuite purifiée sur une colonne Sephadex G25 (NAP-10 ; GE Healthcare) avec du PBS avant d'être passée sur un filtre 0,22 μm Millex (Millipore, Bedford, MA).

III.B.1.2.4 *Utilisation du NaCl comme tampon d'éluion*

Dans le but de simplifier la méthode de radiomarquage pour un transfert chez l'homme, des modifications ont également été apportées dans le choix du tampon d'éluion. Dans la méthode de marquage initiale, le tampon PBS était utilisé afin d'éluier la solution sur la colonne NAP-10. Le NaCl faisant partie de la pharmacopée, nous avons étudié l'effet d'une éluion au NaCl pendant l'étape de purification.

Ci-dessous, un tableau résumant les différentes méthodes de radiomarquage testées.

Tableau 9 : Résumé des différentes optimisations testées pour le radiomarquage de cAbVCAM1-5 au Tc^{99m}

Etape	Température (°C)	Quantité	
		cAbVCAM1-5 (µg)	Tampon
1 ou 2	50 ou 75	50 ou 100	PBS ou NaCl

III.B.1.3 Intermédiaire de réaction tricarbonyle produit aux normes BPF par ERAS labo

Cet intermédiaire de réaction est utilisé afin de coupler le ^{99m}Tc au nanobody. Il est indispensable à son radiomarquage et nécessite qu'il soit produit selon les normes BPF. ERAS labo, une entreprise spécialisée dans la chimie organique basée dans le bassin grenoblois, possède le savoir-faire, et les certifications de l'ANSM pour la production aux normes des BPF.

Cet intermédiaire sous forme lyophilisé est constitué de :

- 8,5mg de tartare de sodium ($Na_2C_4H_4O_6$)
- 7,15 mg de carbonate de sodium (Na_2CO_3)
- 4,5 mg de boranocarbonate de sodium ($Na_2H_3BCO_2$)
- 2,5 mg de tetraborate de sodium ($Na_2B_4O_7$)

Les méthodes de synthèse des différents constituants sont validées, une à une, puis le produit final est contrôlé en dosant le sodium par absorption atomique, le Bore par résonance magnétique nucléaire (RMN) et en contrôlant la biocharge bactérienne. Pour l'instant, la stabilité du produit a été déterminée à 1 an.

Différents intermédiaires tricarbonyles ont été évalués et sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 10 : Les différents intermédiaires de réaction tricarbonyle utilisés lors du radiomarquage de cAbVCAM1-5 au ^{99m}Tc

Intermédiaires tricarbonyl	Industriel	Normes BPF
Lot référence	PSI	Non
ERAS lot 1	ERAS labo	Non
ERAS lot 2	ERAS labo	oui

III.B.2 *Optimisation de la dosimétrie*

Le profil de biodistribution du radiotracer montre une forte rétention de celui-ci dans les reins. En effet, le couple de protéines mégaline/cubiline situé dans le tubule contourné proximal joue un rôle important dans la réabsorption des protéines de faible poids moléculaire ayant échappé au processus de filtration glomérulaire. Ce mécanisme est responsable en grande partie de la forte accumulation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 dans le cortex rénal (Tchouate Gainkam et al., 2011). Ces deux protéines chargées négativement vont capter les protéines chargées positivement pour former un complexe ligand/récepteur qui sera internalisé dans des puits à clathrine et transféré dans les endosomes.

Diminuer cette fixation permettrait d'améliorer la dosimétrie de l'examen. Différentes méthodes permettant d'atténuer la rétention de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 dans le cortex rénal ont été explorées, notamment en diminuant le nombre d'histidines présentes sur la queue polyhistidine (passant de 6HIS à 3HIS), mais également en saturant les récepteurs du complexe mégaline/cubiline par l'injection d'une solution de Gélofusine®. Afin d'évaluer l'impact de ces modifications sur le radiomarquage de cAbVCAM1-5 ou sur sa biodistribution, la pureté radiochimique et des biodistributions par prélèvements d'organes ont été réalisées dont le protocole est décrit dans le chapitre n°III.C.4.2.1 page 225 et dans le chapitre n°III.C.4.2.3.3 page 228 respectivement.

III.B.3 *Validation des Lot BPF de cAbVCAM1-5*

Différents lots correspondant aux différentes modifications apportées au procédé de production ont été nécessaires afin d'obtenir le lot final, produit aux normes BPF. Ces lots ont été fournis au LRB pour effectuer des tests biologiques de vérification. Ces différentes étapes ont été :

1. L'amélioration du rendement de production (optimisation de la séquence ADN du nanobody et du couple hôte/vecteur).
2. Le développement du processus de production (purification, fermenteur) et des méthodes analytiques conformes aux normes BPF
3. La validation du lot final BPF.

III.B.3.1 Optimisation du rendement de production

Dans un premier temps, une étude de faisabilité a été lancée afin d'optimiser le rendement de production. D'une part, la séquence ADN a été légèrement modifiée afin d'améliorer l'index CAI (Codon Adaptation Index), qui permet de prédire le niveau d'expression des gènes. Un acide aminé peut être codé par plusieurs codons qui ont des fréquences d'utilisation différentes en fonction de l'organisme et du type de génome utilisée (mitochondrial, nucléaire,...). Il est donc possible d'améliorer ce rendement de production lorsque pour un acide aminé donné, le codon utilisé n'est pas le plus fréquemment utilisé dans l'espèce cible. Le CAI possède des valeurs comprises entre 0 et 1 suivant la fréquence d'usage des codons pour un gène considéré avec l'ensemble de référence constitué de gènes fortement exprimés. Après l'optimisation du gène codant pour le nanobody anti-VCAM-1 pour l'expression dans la bactérie *E.coli*, le CAI est passé de 0,66 à 0,93.

D'autre part, différents couples hôte/vecteur ont été testés. La séquence ADN optimisée a été clonée dans différents plasmides (PE7, pETac et pHEN20) puis transformée dans des souches bactériennes *E.coli* BLR(DE3) et WK6 à l'aide du CaCl₂. Parmi les 4 couples hôte/vecteur évalués, le meilleur rendement de production a été obtenu en utilisant le couple BLR(DE3)/pE7. Le lot standard, qui a servi de contrôle pour ces différentes étapes, a été produit en utilisant le couple WK6/pHEN20. A l'issue de ces étapes d'optimisation, des analyses *in vitro* ont été réalisées sur le lot PX-1.

Après validation de celui-ci *in vitro*, un deuxième lot (Px-2) similaire au précédent, produit en quantité plus importante pour être radiomarqué au ^{99m}Tc a permis de réaliser des analyses de pureté, de stabilité radiochimique ainsi que l'évaluation de sa distribution chez la souris C57BL/6J. Une banque cellulaire initiale (ICB) a été générée, qui servira pour la production des futurs lots.

III.B.3.2 Développement du *processus* de production et d'analyse

Dans un deuxième temps, le processus de production et les méthodes analytiques ont été développés. D'une production en flasque, nous sommes passés à une production en fermenteur de 30L, à partir du troisième lot, Px-3 (Tableau 12). La méthode de purification a été modifiée afin de respecter les normes BPF. Elle était auparavant effectuée par chromatographie sur ions

métalliques immobilisées, sur des colonnes IMAC (immobilized metal affinity chromatography). Cependant de telles colonnes peuvent libérer des résidus de nickel et sont donc incompatible avec les BPF. Le nanobody anti-VCAM-1 a donc été purifiée sur deux colonnes à cations successives que sont la SP Sépharose[®] puis sur Poros[®] XS. Parallèlement à ces modifications, les méthodes analytiques ont été développées afin de contrôler le processus de production et de caractérisation du lot final BPF (Tableau 11). Les lots issus de ces productions ont été transférés au laboratoire pour être analysés *in vitro* et *in vivo*.

Enfin, une banque cellulaire mère (MCB) a été produite à partir de l'ICB et servira pour les prochaines productions de lots BPF. Les méthodes analytiques développées afin d'évaluer la qualité du produit fini sont listées ci-dessous.

Tableau 11 : Méthodes analytiques

Méthodes	Description
Inspection visuelle	Apparence physique du produit (clarté, couleur, particules visibles)
Tests microbiens sur un produit non stérile	Filtration du produit sur une membrane
Dosage de la concentration en nanobody par UV	Concentration du lot déterminée par des tests ultra-violets
Identification et pureté du nanobody évalué	SDS-PAGE : identification par électrophorèse en SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de coomassie RP-UPLC par détection en UV et masse
Pureté déterminée par SE-UPLC	Détection d'agrégat et de monomères par chromatographie d'exclusion utilisant une colonne permettant la séparation des molécules par leur taille

III.B.3.3 Synthèse et reformulation du lot BPF

Un premier lot de cAbVCAM1-5 produit selon les BPF a été obtenu en 2017. Le procédé de production du lot clinique comprenait une production initiale de biomasse par fermentation en *E.coli*. Le nanobody était ensuite extrait de l'espace périplasmique et purifié par deux étapes chromatographiques par échange d'ions. Le produit obtenu était conforme aux spécifications. Néanmoins, après quelques mois de stockage à -70°C, il est apparu des particules détectables par inspection visuelle. Dans le but d'améliorer la stabilité de la molécule, une étude de reformulation a été réalisée par PxTherapeutics afin de prévenir l'apparition de ces particules par l'ajout de différents excipients (polysorbate 20 et 80, tampon acétate, sucres, acides aminés). Différentes

conditions de reformulation ont ainsi été testées. Des cycles de congélation/décongélation, un stress mécanique (seringue) et une étude de stabilité à 37°C durant 7 jours ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité de ces excipients. Au final, le polysorbate 20 (à 0,005% et 0,05%) et le polysorbate 80 (à 0,001% et 0,01%) ont été les 2 excipients les plus efficaces, retardant l'apparition de particules visibles jusqu'au 10^{ème} cycle de congélation/décongélation. Des études supplémentaires ont été réalisées afin de s'assurer que la biodistribution du nanobody radiomarqué au ^{99m}Tc n'était pas altérée par cet ajout d'excipient. Les plus fortes concentrations de polysorbate ont été choisies afin de réaliser ces investigations (Tableau 13).

Ci-dessous, un tableau récapitulatif des différents lots produits et testés *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*.

Tableau 12 : Production des différents lots de nanobody anti-VCAM-1.

Lots cAbVCAM1-5	Tests réalisées	Hôte (E coli)/Vecteur	Production	Purification
Lot référence	<i>In vitro/in vivo et ex vivo</i>	WK6/pHEN20	Flasque	IMAC
PX-1	<i>In vitro</i>	BLR(DE3)/PE7	Flasque	IMAC
PX-2	<i>In vivo et ex vivo</i>	BLR(DE3)/PE7	Flasque	IMAC
PX-3	<i>In vitro/in vivo et ex vivo</i>	BLR(DE3)/PE7	Fermenteur	Echangeuse à cations
PX-4 (End to end)	<i>In vitro/in vivo et ex vivo</i>	BLR(DE3)/PE7	Fermenteur	Echangeuse à cations
PX-5 (Lot technique)	<i>In vitro/in vivo et ex vivo</i>	BLR(DE3)/PE7	Fermenteur	Echangeuse à cations
PX-6(BPF)	<i>In vitro/in vivo et ex vivo</i>	BLR(DE3)/PE7	Fermenteur	Echangeuse à cations
Reformulation PX-6(BPF)	<i>In vitro/in vivo et ex vivo</i>	BLR(DE3)/PE7	Fermenteur	Echangeuse à cations

III.B.4 Méthodes d'évaluation

III.B.4.1 Non radiomarqué (SPR)

L'affinité des différents lots produits par PxTherapeutics pour VCAM-1 murin et humain a été déterminée à l'aide d'un Biacore 3000 (GE Healthcare), instrument utilisant le phénomène de Résonance Plasmonique de Surface (SPR). Cette technique repose sur la mesure de la variation de l'angle de résonance qui est

directement proportionnelle à la quantité d'analyte fixé. En effet, lorsqu'une lumière polarisée est émise à l'interface entre deux milieux à indice de réfraction différents, celle-ci est en partie réfléchi sur l'interface et une autre partie est réfractée à travers la surface. Lorsque cette lumière est dirigée avec un certain angle (angle de résonance) sur une lamelle d'or (riche en électrons) par exemple, les photons provoquent une oscillation des électrons libres appelée Résonance Plasmonique de Surface (SPR). Les interactions moléculaires entre l'analyte et le ligand immobilisé sur la puce vont entraîner des modifications de l'indice de réfraction qui vont faire varier l'angle de résonance qui sera proportionnel à la quantité d'analyte lié. Cet angle est exprimé en unité de résonance (RU).

A partir d'un modèle de simple interaction ligand-récepteur (Biaevaluation software, Biacore), la constante de dissociation des différents lots a été déterminée et exprimée en nM.

Brièvement, les protéines recombinantes VCAM-1 murine et humaine (R&D systems) ont été immobilisées par couplage amine sur une puce CM5 (GE Healthcare). Celle-ci est composée de dextran fixé sur une fine couche d'or, et possède 4 pistes, appelées flow chamber (FC). La FC-1 a servi de contrôle négatif (sans immobilisation de protéine recombinante) et a été soustraite aux 3 autres pistes sur lesquelles ont été immobilisées la protéine recombinante VCAM-1 murine à 4 µg/ml sur la FC2 et humaine à 4 µg/ml sur la FC3 et FC4 à environ 1500 RU pour chacune des pistes. Les analytes ont été mis en contact avec la surface des différentes pistes après dilutions successives au demi allant de 50 à 0,78 nM. L'analyse en Biacore a été effectuée sur les 6 lots et comparée au lot de référence (lot référence, LRB). Les études pour chaque concentration en analyte ont été réalisées en duplicat et les résultats ont été moyennés. La constante de dissociation à l'équilibre (Kd) est exprimée en nM.

III.B.4.2 Radiomarqué

III.B.4.2.1 *Pureté radiochimique (PRC) et stabilité*

Pour toutes les conditions testées, l'évaluation de la pureté radiochimique (PRC) a été déterminée par RP-HPLC directement dans le milieu de marquage à différents temps (0 et 6h post-radiomarquage). Pour certaines conditions, la

stabilité du radiomarquage a été évaluée jusqu'à 24h (température et tampon). cAbVCAM1-5 radiomarqué au ^{99m}Tc par la technique de radiomarquage initiale présente un pic d'activité majoritaire élué à 16 min. Le radiomarquage est considéré comme étant stable lorsque la PRC de celui-ci est >95%.

III.B.4.2.2 *Analyse in vitro de l'affinité de cAbVCAM1-5 radiomarqué au ^{99m}Tc*

Les expériences de liaison par saturation ont consisté à immobiliser sur la nuit à 4°C la protéine recombinante humaine ou murine (R&D systems) à 1 µg/mL dans des puits d'une plaque 96 puits, une solution de PBS seul servant de contrôle. Une étape de blocage (BSA 2% pendant 1h à température ambiante) a été effectuée afin de réduire la fixation non spécifique. Après aspiration de la solution de blocage, la molécule radiomarquée a été incubée durant 1h à température ambiante à des concentrations croissantes. Une étape de lavage a été réalisée afin de réduire le signal non spécifique. Le comptage de l'activité dans les puits était effectué à l'aide du compteur gamma (Wizard² ; Perkin). L'activité des puits contrôles a été soustraite à l'activité des puits incubés avec la protéine recombinante afin de rendre compte de la fixation spécifique. La valeur de fixation spécifique a été ajustée en suivant un modèle de régression non linéaire réalisée avec le logiciel GraphPad Prism.

III.B.4.2.3 *Evaluation in vivo et ex vivo de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5*

III.B.4.2.3.1 *Modèle animal :*

Toutes les expériences ont été approuvées par le comité d'éthique de l'université Grenoble Alpes et le ministère de la recherche.

III.B.4.2.3.1.a *Optimisation du radiomarquage et évaluation des lots et de l'intermédiaire tricarbonyl produits aux BPF*

Des souris femelles C57BL/6J (n=68) (Charles-River, France), âgées de 10 semaines et nourries avec un régime standard, ont été utilisées. Soixante souris ont été nécessaires afin d'évaluer les différentes modifications apportées aux lots et/ou au protocole de radiomarquage. Les conditions de radiomarquage initiales ont été évaluées sur un groupe de 8 souris (Tableau 13).

Des souris ApoE^{-/-} femelles (n=15) (PHTA, UGA) sous régime Western durant 30 semaines ont été utilisées afin de valider les conditions finales.

Les paramètres en gras correspondent aux paramètres qui ont été évalués pour chaque étude et comparés aux paramètres précédemment validés. Par exemple, dans l'étude numéro 3, nous avons étudié le lot 2 produit par PX-Therapeutics (Tableau 13).

III.B.4.2.3.1.b Optimisation de la dosimétrie

Concernant l'étude évaluant l'effet du raccourcissement de la queue polyhistidine (3HIS au lieu de 6HIS) sur la rétention rénale, quatorze souris femelles C57BL/6J (Tag 3HIS étude 1) âgées de 11 semaines sous régime standard provenant de chez Charles river, et quatorze souris femelles ApoE^{-/-} (Tag 3HIS étude 2) provenant de la PHTA (UGA), âgées de 14 semaines sous régime Western durant 20 semaines ont été utilisées (Tableau 13).

Douze souris femelles C57Bl/6J provenant de chez Charles river et âgées de 11 semaines ont été réparties aléatoirement en 2 groupes de 6 souris pour l'étude des effets de la Gélofusine[®] sur la rétention rénale du radiotracteur (Tableau 13).

III.B.4.2.3.2 Imagerie SPECT/CT

III.B.4.2.3.2.a Optimisation du radiomarquage et évaluation des lots BPF

Des acquisitions en imagerie SPECT/CT ont été réalisées sur certaines souris des études 1, 4, 8, 10, 11, 12 et 13.

^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 a été injecté dans l'une des veines latérales de la queue de souris vigiles, avec des activités décrites dans les tableaux présentant les résultats de la biodistribution par prélèvements d'organes. Deux heures après l'injection du radiotracteur, les souris ont été anesthésiées sous isoflurane 1,5% (Baxter) et placées sur un lit chauffant. Une acquisition SPECT (nanoSPECT/CT, MEDISO) corps entier a été réalisée avec les paramètres suivants : 24 projections d'une durée de 120 sec chacune pour un temps total de 50 min. Les repères anatomiques ont été obtenus par imagerie aux rayons X (CT), après l'acquisition SPECT avec comme paramètres : 360 projections de 70 ms chacune, à 45 kvp. Les acquisitions SPECT/CT ont été reconstruites et fusionnées avec le logiciel InVivoscope (Bioscan).

III.B.4.2.3.2.b Optimisation de la dosimétrie

Pour l'étude évaluant l'effet du tag 3HIS, 8 souris C57BL/6J et 6 souris ApoE^{-/-} ont reçu dans une des veines latérales de la queue une injection de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 (3HIS) avec une activité de 43,5 ± 12,3 MBq et de 48,0 ± 12,8 MBq respectivement. Huit souris ApoE^{-/-} et six C57BL/6J ont été injectées par voie intraveineuse avec une solution de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5(6HIS) d'une activité de 71,0 ± 3,0 et 55,4 ± 3,6 MBq respectivement. Des acquisitions corps entier par imagerie SPECT/CT ont été réalisées 2h après l'injection du radiotracteur.

Dans le cas de l'étude Gélofusine[®], 6 souris ont été injectées dans l'une des veines latérales de la queue avec une solution comportant un mélange de 40 µL de sérum physiologique (véhicule) et 100 µL de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 (33,2 ± 9,0 MBq). Le deuxième groupe a reçu une injection d'une solution contenant 40 µL de Gélofusine[®] (BBraun, France) à 80 mg/kg et 100 µL de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 (35,9 ± 7,7 MBq). Deux heures après l'injection du radiotracteur, les animaux ont été anesthésiés sous isoflurane 1,5%. Une acquisition SPECT/CT a été réalisée sur une période d'une heure.

III.B.4.2.3.3 Biodistribution

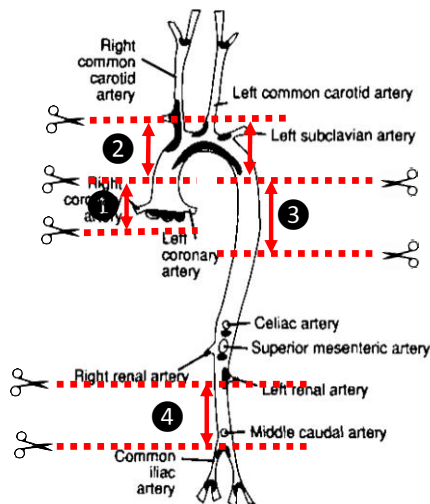


Figure 100 : Schéma d'isolation des différents segments aortiques prélevés. Des incisions (pointillés rouges) réalisées sous binoculaire ont été effectuées afin de prélever l'aorte ascendante (1), la crosse aortique (2), l'aorte thoracique (3) et l'aorte abdominale (4). Les lésions athéromateuses chez les souris ApoE^{-/-} sont visibles dans les régions surlignées en noir (valves aortiques, crosse aortique, et au niveau de la plupart des bifurcations).

Trois heures après l'injection de ^{99m}Tc-AbVCAM1-5, les souris ont été euthanasiées par inhalation de CO₂. L'aorte a été délicatement prélevée et nettoyée. Des segments d'aorte thoracique et d'aorte abdominale (incision sous l'artère mésentérique supérieure et au-dessus de la bifurcation des artères iliaques) ont été prélevés sur des souris C57BL/6J (Figure 100). Pour les souris ApoE^{-/-} sous régime Western, l'aorte ascendante et

la crosse aortique ont été également prélevées afin de quantifier la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 au sein des lésions athéromateuses. Puis, les autres organes et tissus d'intérêt ont été prélevés, rincés dans du NaCl, pesés et comptés au compteur gamma (Wizard², Perkin). L'activité a été corrigée du bruit de fond, de la décroissance radioactive, de la masse des échantillons prélevés, de la dose injectée, et exprimée en pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (% DI/g).

III.B.1 *Analyses statistiques*

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type. Un test de Fischer a été systématiquement réalisé afin de déterminer l'égalité des variances. En cas d'égalité, un test-t de Student a été utilisé. Dans le cas contraire, un test non paramétrique de Mann-Whitney a été effectué (GraphPad v6, USA). Le seuil de significativité statistique a été fixé pour des valeurs de P inférieures à 0,05.

Tableau 13 : Résumé des différentes études de biodistribution réalisées. Pour chacune des études, le paramètre faisant l'objet de l'évaluation est indiqué en gras (P20, P80 : polysorbate)

	Etudes	Lots cAbVCAM1-5 (LRB ou Px)	Température (50 ou 75°C)	Etape (1 ou 2)	Intermédiaire tricarboneyle (PSI ou ERAS)	Tampon (PBS ou NaCl)	Masse nanobody (50 ou 100 µg)	Animaux (C57BL/6J ou ApoE ^{-/-})
Etudes visant à évaluer la production des lots de l'intermédiaire tricarboneyle et du nanobody anti VCAM-1 ainsi que des conditions d'optimisation du radiomarquage	1 (initiale)	LRB	50	2	PSI	PBS	50	C57BL/6J (n=8)
	2	LRB	75	2	PSI	PBS	50	C57BL/6J (n=6)
	3	Px-2	75	2	PSI	PBS	50	C57BL/6J (n=6)
	4	LRB	75	2	PSI	NaCl	50	C57BL/6J (n=6)
	5	PX-2	75	2	ERAS lot 1	PBS	50	C57BL/6J (n=6)
	6	LRB	75	1	PSI	PBS	50	C57BL/6J (n=6)
	7	Px-3	75	2	PSI	PBS	50	C57BL/6J (n=3)
	8	Px-4	75	2	PSI	PBS	100	C57BL/6J (n=3)
	9	Px-4	75	2	ERAS lot 2	NaCl	100	C57BL/6J (n=6)
	10	Px-5	75	2	ERAS lot 2	NaCl	100	C57BL/6J (n=3)
	11	Px-6 (BPF)	75	2	ERAS lot 2	NaCl	100	C57BL/6J (n=6)
	12	Px-6 (P20 et P80)	75	2	ERAS lot 2	NaCl	100	C57BL/6J (n=9)
	13 (finale)	Px-6 (P 80 0,01%)	75	2	ERAS lot 2	NaCl	100	ApoE^{-/-} (n=15)
Evaluation des méthodes d'optimisation de la dosimétrie	Gélofusine	LRB	50	2	PSI	PBS	50	C57BL/6J(n=12)
	Tag 3his (Etude1)	LRB	50	2	PSI	PBS	50	C57BL/6J(n=14)
	Tag 3his (Etude2)	LRB	50	2	PSI	PBS	50	ApoE^{-/-} (n=14)

III.C Résultats

III.C.1 Optimisation du radiomarquage de cAbVCAM1-5 au technétium ^{99m} et évaluation de l'intermédiaire de réaction tricarbonyle produit aux normes BPF

III.C.1.1 Pureté radiochimique (PRC) des différentes méthodes de radiomarquage

Tableau 14: Pureté Radiochimique des différentes méthodes de radiomarquage de cAbVCAM1-5 déterminée par RP-HPLC au temps initial, 6h et 24h post-radiomarquage. (PRC>95%, PRC<95%. nd= non déterminé).

Temps (h)	75 °c	cAbVCAM1-5 100 µg	NaCl	Kit tricarbonyle (1 et 2)	1 étape
0	✓	✓	✓	✓	✓
6h	✓	✓	✓	✓	X
24h	✓	nd	✓	nd	nd

Le tableau ci-dessus (Tableau 14) résume les différents résultats obtenus concernant la stabilité de radiomarquage des différentes conditions de radiomarquage testées (quantité de cAbVCAM1-5, radiomarquage en une étape, température, tampon NaCl, ainsi que de l'intermédiaire tricarbonyle). Le seul résultat jugé non conforme concerne la stabilité du radiomarquage en 1 étape de cAbVCAM1-5 au ^{99m}Tc, avec une PRC<90% à 6h post-radiomarquage. Pour toutes les autres conditions testées, les profils de RP-HPLC ont présenté des PRC>95% à 0, 6 et 24h post-radiomarquage.

A titre d'exemple, les radiochromatogrammes obtenus après modification de la température (Figure 101) ou du nombre d'étape (Figure 102) sont présentés en figure 101 et 102.

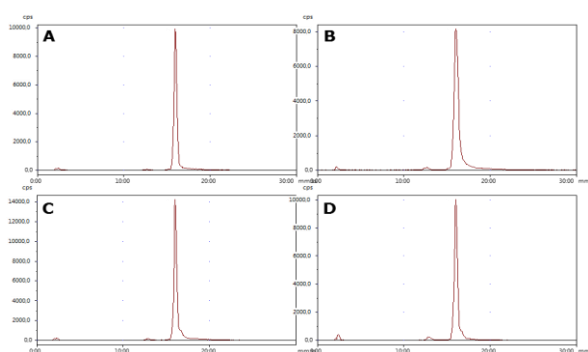


Figure 101 : Profils de stabilité effectués au temps initial (A, C) et 24h (B, D) post-radiomarquage de cAbVCAM1-5 radiomarqué au ^{99m}Tc avec la méthode initiale (50°C) (A, B) et à 75 °C (C, D).

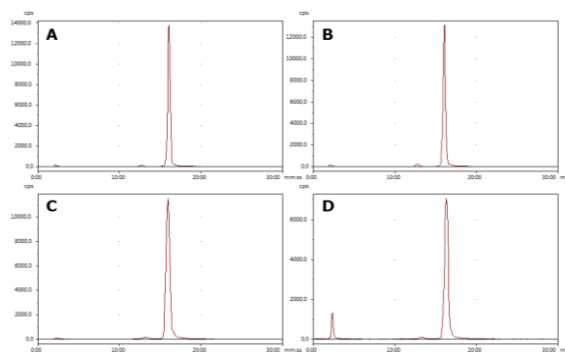


Figure 102 : Radiochromatogrammes obtenus par RP-HPLC de cAbVCAM1-5 radiomarqué au ^{99m}Tc avec la méthode initiale (A, B) ou la méthode "une étape" (C, D), réalisés à 0h (A, C) et 6h (B, D) post-radiomarquage.

III.C.1.2 Analyse par saturation de liaison de l'affinité de cAbVCAM1-5 radiomarqué au ^{99m}Tc suivant les différentes méthodes d'optimisation du radiomarquage.

La fixation spécifique du nanobody radiomarqué a été déterminée par soustraction de l'activité des puits où la protéine recombinante VCAM-1 humaine et murine a été adsorbée (fixation totale) à l'activité de puits vides (fixation non spécifique) et ajustée à partir d'un modèle ligand-récepteur, permettant de déterminer des constantes de dissociation. Les paramètres testés n'ont pas modifié l'affinité de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 à la protéine recombinante VCAM-1 humaine ou murine (Tableau 15). Nous n'avons pas réalisé cette évaluation pour la condition 1 étape.

Tableau 15 : Analyse par saturation de liaison de l'affinité de cAbVCAM1-5 radiomarqué au ^{99m}Tc suivant les différentes conditions d'optimisation du radiomarquage et de l'intermédiaire de réaction tricarbonyle produit aux BPF.

Protéine recombinante VCAM-1	Validation des conditions testées		Conditions testées			
	Constantes de dissociation kd (nM)	75 °c	cAbVCAM1-5 100 µg	NaCl	Intermédiaire Tricarbonyle (1 et 2)	1 étape
Humaine	15<kd<35	✓	✓	✓	✓	nd
Murine	3<kd<10	✓	✓	✓	✓	nd

A titre d'exemple, l'augmentation de la température lors du radiomarquage de cAbVCAM1-5 au ^{99m}Tc n'a eu aucun effet sur sa liaison à la protéine recombinante VCAM-1 humaine (31 nM vs 27 nM) (Figure 103).

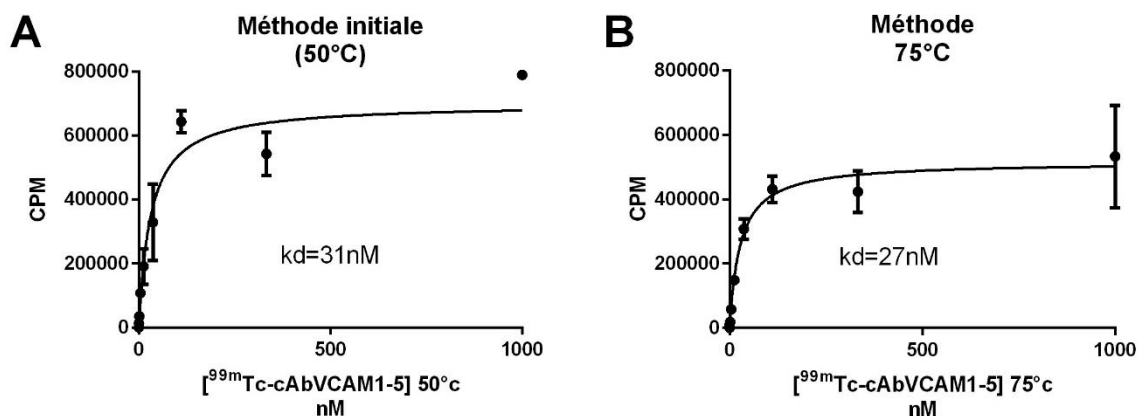


Figure 103 : Constante de dissociation déterminée à partir de la liaison spécifique de cAbVCAM1-5 radiomarqué en suivant le protocole de radiomarquage initiale (50°C) (A) ou de la modification de la température à 75°C (B), à la protéine recombinante humaine VCAM-1. CPM = coups par minute.

III.C.1.3 Biodistribution par prélèvements d'organes

Dans le tableau ci-dessous (Tableau 16), sont résumés les résultats obtenus de la biodistribution par prélèvements d'organes (*ex vivo*) de cAbVCAM1-5 radiomarké au ^{99m}Tc suivant les différents paramètres d'optimisation testés chez des souris C57BL/6J et ApoE^{-/-}.

Tableau 16 : Analyse en biodistribution par prélèvements d'organes des différentes conditions testées et comparées à la condition de radiomarquage initiale de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 chez des souris C57BL/6J et ApoE^{-/-}.

Souris	Conditions testées				
	75 °c	Quantité cAbVCAM1-5	NaCl	Intermédiaire tricarbonyle	1 étape
C57BL/6J	✓	✓	✓	✓	✓
ApoE ^{-/-}	nd	nd	nd	nd	✓

III.C.1.3.1 Evaluation de la biodistribution de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 chez des souris saines (souris C57BL/6J)

La distribution de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 a été évaluée *ex vivo* par comptage gamma des organes prélevés chez des souris C57BL/6J, euthanasiées 3 heures après injection du radiotracer. Le profil de distribution de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 radiomarké avec la méthode initialement utilisée a présenté une forte captation du traceur dans les organes lymphoïdes secondaires >1% DI/g et une plus faible captation dans les organes et tissus non spécifiques (<1% DI/g). De plus, son élimination est principalement rénale avec une captation proche de 300% DI/g. Une faible activité sanguine a également été observée, de l'ordre de $0,3 \pm 0,0\%$ DI/g (Tableau 17).

Malgré quelques différences significatives de faible amplitude observées occasionnellement dans certains organes (tels que le thymus pour la condition 75°C et la rate pour la condition en une étape), les profils de biodistribution sont tous comparables au profil obtenu avec les conditions initiales de radiomarquage (Tableau 17).

Tableau 17: Evaluation de l'intermédiaire tricarbonyle (ERAS labo) et des différentes méthodes visant à optimiser le radiomarquage de cAbVCAM1-5 au ^{99m}Tc en biodistribution par prélèvement d'organes chez des souris C57Bl/6J, * $P < 0,05$ vs condition initiale. (DI= Dose injectée, AoTh = Aorte thoracique saine, AoAb = aorte abdominale saine, Gs = glande salivaire, Mo = Moelle osseuse).

Paramètres	$^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ (%DI/g)					
	Initiale	Température 75°C	Tampon NaCl	Intermédiaire tricarbonyle ERAS	1 étape	Masse cAbVCAM1-5 100µg
Etude	1	2	3	4	5	8
Effectifs (n)	8	6	6	6	6	3
AoTh	0,5 ± 0,1	ND	0,7 ± 0,1*	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
AoAb	0,6 ± 0,3	ND	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,3
Bile	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0	1,6 ± 2	0,4 ± 0,1
Cerveau	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Cœur	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0
Estomac	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1**	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0
Foie	1,1 ± 0,4	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,3
Ganglions	3,3 ± 0,7	2,3 ± 1,5	2,2 ± 0,4	3,7 ± 2,2	2,5 ± 0,7	5,2 ± 1,8
Gs	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0	0,3 ± 0	0,5 ± 0,1*	0,3 ± 0,1
Intestin	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Mo	5,0 ± 2,1	6 ± 3,2	4,9 ± 1,4	6,7 ± 2	7,5 ± 3,2	6,6 ± 2,5
Muscle	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0
Poumon	1,8 ± 0,5	1,8 ± 0,5	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,3	2,4 ± 2,9	3,5 ± 3,4
Rate	7,7 ± 1,0	7,3 ± 1,8	7,9 ± 0,5	6,3 ± 1,4	5,5 ± 1,5*	9,2 ± 1,8
Rein	298,2 ± 22,8	333,9 ± 9,2**	324,1 ± 20,5	318 ± 45,6	255,7 ± 23,3*	328,4 ± 14,4
Sang	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1**	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Thymus	1,4 ± 0,4	1 ± 0,3*	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,8	1,6 ± 0,3
Thyroïdes	1,3 ± 0,6	2,1 ± 0,9	1,2 ± 0,7	1,1 ± 0,6	3,3 ± 2,5	1,1 ± 0,3

III.C.1.3.2 Evaluation de la biodistribution de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ au sein des lésions athéromateuses (souris ApoE^{-/-})

La méthode de marquage en une étape a fait l'objet d'une étude en biodistribution par prélèvements d'organes supplémentaire, chez un modèle de souris ApoE^{-/-} sous régime hypercholestérolémiant durant 20 semaines (Tableau 18). Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous. Le profil de biodistribution est comparable à la méthode initiale de référence (Etude 1).

Seules les activités rénales et thymiques ont diminué significativement ($202,5 \pm 20,7\%$ DI/g vs $137,3 \pm 39,9\%$ DI/g ; $2,8 \pm 0,4\%$ DI/g vs $1,9 \pm 0,5\%$ DI/g). Pour le reste des tissus étudiés, aucune différence significative de captation n'a été observée. Les deux modèles animaux utilisés (C57Bl/6J et ApoE^{-/-}) n'ont pas mis en évidence de différence importante dans la fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 marqué avec la méthode 1 étape. Ce profil de biodistribution avec un ciblage préservé des organes exprimant VCAM-1 mais avec une diminution de la rétention rénale est intéressant en terme de dosimétrie. Néanmoins, dû à une plus faible stabilité radiochimique, le développement de cette nouvelle méthode a été arrêté.

Table 18 : Biodistribution par prélèvements d'organes de cAbVCAM1-5 radiomarké au ^{99m}Tc avec la méthode "1 étape" chez des souris ApoE^{-/-} sous régime Western. *P<0,05.

	Méthodes de radiomarquage	
	Initiale (2 étapes)	1 étape
Effectif (n)	5	6
Masse corporelle (g)	31,7 ± 4,0	31,7 ± 5,6
Dose injectée (MBq)	53,9 ± 4,3	51,2 ± 7,7
Aorte ascendante	1,9 ± 0,4	1,7 ± 0,4
Crosse aortique	2,5 ± 0,8	2 ± 0,7
Aorte abdominale	1,1 ± 0,6	0,8 ± 0,6
Bile	1,2 ± 1	1,3 ± 0,7
Cerveau	0 ± 0	0 ± 0
Cœur	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2
Estomac	0,7 ± 0,2	1,3 ± 0,8
Foie	1,8 ± 0,3	1,7 ± 0,5
Ganglions	3,7 ± 1,2	4,1 ± 2,3
Glandes salivaires	0,7 ± 0,4	1,2 ± 0,5
Intestin	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,3
Moelle osseuse	4,7 ± 2,8	3,4 ± 1,3
Muscle	0,1 ± 0	0,1 ± 0
Poumon	2,4 ± 0,6	2 ± 0,7
Rate	12,3 ± 1,1	9,7 ± 3,4
Rein	202,5 ± 20,7	137,3 ± 39,9*
Sang	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,3
Thymus	2,8 ± 0,4	1,9 ± 0,5*
Thyroïdes	1,8 ± 1,5	1,9 ± 1,5

Ci-dessous, un tableau récapitulatif des différentes conditions de marquage testées (Tableau 19). Parmi les différents paramètres évalués, tous ont été conservés (intermédiaire tricarbonyle ERAS, 75°C, 100 µg et NaCl) hormis la méthode de radiomarquage en une étape qui présentait une stabilité 6h post radiomarquage plus faible que la méthode initiale.

Tableau 19 : Résumé des conditions testées et des paramètres conservés pour le transfert clinique de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5.

	Animaux	75 °c	Masse 100µg	NaCl	Intermédiaire tricarboxyle ERAS labo	1 étape
PRC		✓	✓	✓	✓	X
Affinité radiomarqué <i>In vitro</i>		✓	✓	✓	✓	✓
Biodistribution (<i>ex vivo</i>)	C57BL/6J ApoE ^{-/-}	✓ nd	✓ nd	✓ nd	✓ nd	✓ ✓
Bilan (Conditions retenues pour le transfert en clinique)		✓	✓	✓	✓	X

III.C.2 Optimisation de la dosimétrie

III.C.2.1 Pureté radiochimique du radiomarquage de cAbVCAM1-5(3HIS) au ^{99m}Tc

La PRC de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5(3HIS) a été similaire à la méthode de radiomarquage initiale avec une élution du produit technétié à 16 min et une PRC à 0h et 6h >95% (Figure 104).

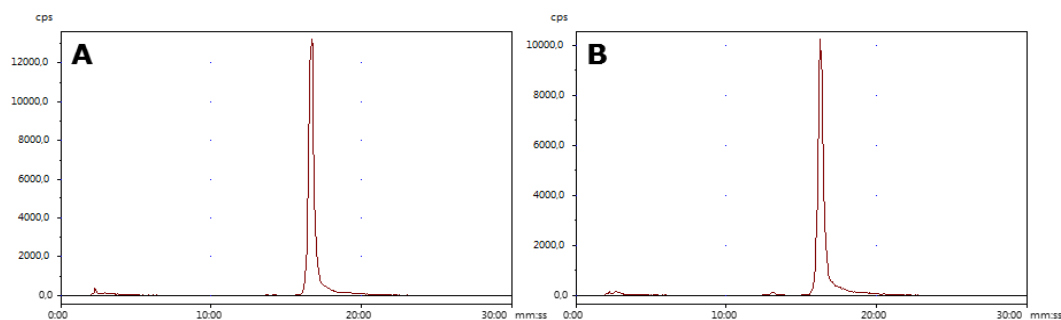


Figure 104 : Profils de stabilité de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5(3HIS). Radiochromatogrammes obtenus à (0h) et 6h (B) après radiomarquage.

III.C.2.2 Biodistribution par prélèvements d'organes

III.C.2.2.1 Tag HIS

La réduction du tag poly-HIS a profondément modifié la biodistribution du radiotracteur (Tableau 20). En effet, on a pu constater une augmentation significative de la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 (3HIS) au niveau de la plupart des tissus n'exprimant pas VCAM-1 (cœur, bile, foie, estomac, glandes salivaires, muscle, poumon, thyroïdes) en comparaison du groupe contrôle, en raison notamment d'une activité sanguine significativement supérieure chez les souris C57Bl/6J et ApoE^{-/-} du groupe 3 HIS ($0,3 \pm 0,0\%$ DI/g vs $1,5 \pm 0,2\%$ DI/g et $0,6$

$\pm 0,2\%$ DI/g vs $1,9 \pm 0,3\%$ DI/g, respectivement). Néanmoins, aucune différence de captation du radiotracteur n'a été observée dans les organes lymphoïdes secondaires hormis les ganglions lymphatiques des souris C57Bl/6J qui ont présenté une diminution significative de la captation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ (3HIS) ($3,3 \pm 0,7\%$ DI/g vs $1,9 \pm 0,8\%$ DI/g).

Comme attendu, une diminution significative de l'activité rénale d'environ 41% pour le groupe injecté au $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ (3HIS) comparé au groupe 6 HIS ($298,2 \pm 22,8\%$ DI/g vs $174,5 \pm 46,5\%$ DI/g) a été observée. En revanche, chez les souris ApoE^{-/-}, la réduction du tag HIS n'a pas eu d'effet sur la rétention de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ par le cortex rénale ($138,7 \pm 24,2\%$ DI/g vs $144,0 \pm 43,5\%$ DI/g).

Suite à ces résultats, nous n'avons pas poursuivi le développement de cAbVCAM1-5 (3HIS).

Tableau 20 : Biodistribution 3 heures après l'injection de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ 3HIS et 6 HIS chez des souris C57Bl/6J sous régime standard et ApoE^{-/-} sous régime Western pendant 20 semaines, P *<0,05, **<0,01, ***<0,001 vs 6HIS C57Bl/6J ; †<0,05, ††<0,01, ††† <0,001 vs 6HIS ApoE^{-/-}. Les valeurs sont exprimées en % DI/g.

Souris	C57Bl/6J		ApoE ^{-/-}	
	6HIS	3HIS	6 HIS	3 HIS
$^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$				
Effectif (n)	8	8	8	6
Dose injectée (MBq)	56,3 ± 8,5	43,6 ± 12,3	71 ± 3	48 ± 12,8
Aorte ascendante	ND	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2	2,2 ± 0,5††
Crosse aortique	ND	1,1 ± 0,4	1,4 ± 0,6	2,4 ± 1
Aorte abdominale	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,4	0,7 ± 0,2	1,5 ± 0,6††
Bile	0,5 ± 0,3	1 ± 0,4**	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,3††
Cœur	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,2***	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,1†††
Estomac	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1***	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,3††
Foie	1,1 ± 0,4	2,2 ± 0,3***	1,5 ± 0,3	2,8 ± 0,4†††
Ganglions	3,3 ± 0,7	1,9 ± 0,8**	2,8 ± 0,9	3,7 ± 1,2
Glandes salivaires	0,3 ± 0,1	1 ± 0,3***	0,7 ± 0,4	1,3 ± 0,4†
Moelle osseuse	5 ± 2,1	5,3 ± 3,1	4 ± 1,2	4,4 ± 1,4
Muscle	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0**	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1†
Poumon	1,8 ± 0,5	2,6 ± 0,3**	1,7 ± 0,4	4,6 ± 2,7††
Rate	7,7 ± 1	6,8 ± 1,2	8,8 ± 1,9	9,3 ± 2
Rein	298,2 ± 22,8	174,5 ± 46,5***	138,7 ± 24,2	144 ± 43,5
Sang	0,3 ± 0	1,5 ± 0,2***	0,6 ± 0,2	1,9 ± 0,3†††
Thymus	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,3	2,1 ± 0,4	2,4 ± 0,6
Thyroïdes	1,3 ± 0,6	3,7 ± 1,8**	1,2 ± 0,6	3,1 ± 1,2†

III.C.2.2.2 Gélofusine

La deuxième approche qui a été testée, a consisté à co-administrer avec le radiotracteur et par voie intraveineuse une solution de Gélofusine, permettant la saturation des sites du couple mégaline/cubiline, et ainsi réduire la rétention du

radiotracteur par le cortex rénal (Tableau 21). Les résultats obtenus chez des souris C57Bl/6J 3 heures après l'injection de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ ont permis de mettre en évidence une diminution significative de l'activité rénale d'environ 27% pour le groupe co-injecté avec la Gélofusine en comparaison au groupe contrôle ($245,4 \pm 33,4$ % DI/g vs $179,3 \pm 17,7\%$ DI/g). De plus, l'activité sanguine a également été diminuée significativement par rapport au groupe contrôle, mais cet effet est resté négligeable étant donné la faible différence entre les deux groupes ($0,6 \pm 0,1\%$ DI/g vs $0,5 \pm 0,1\%$ DI/g). Enfin, nous n'avons pas observé d'effet de la Gélofusine sur la captation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ sur le reste des tissus et organes prélevés.

Tableau 21 : Evaluation de l'effet d'une co-injection de Gélofusine sur la rétention rénale de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ en biodistribution par prélèvements d'organes chez des souris C57Bl/6J, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs contrôle, Les données sont exprimées en % DI/g.

	Conditions	
	Contrôle	Gélofusine (4%)
Effectif (n)	6	6
Masse corporelle (g)	22,7 ± 0,6	22,7 ± 1,3
Dose injectée (MBq)	33,2 ± 9	35,9 ± 7,7
Aorte thoracique	0,8 ± 0,5	0,7 ± 0,4
Aorte abdominale	0,8 ± 0,4	0,9 ± 0,6
Bile	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,1
Cerveau	0,1 ± 0,1	0 ± 0
Cœur	0,4 ± 0	0,3 ± 0,1
Estomac	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2
Foie	1,2 ± 0,5	1,3 ± 0,1
Ganglions	2,5 ± 0,7	2,2 ± 1,8
Glandes salivaires	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2
Intestin	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1
Moelle osseuse	6,5 ± 2,5	6,9 ± 4
Muscle	0,1 ± 0	0,1 ± 0
Poumon	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,3
Rate	8,6 ± 0,7	8,4 ± 1,3
Rein	245,4 ± 33,4	179,3 ± 17,7**
Sang	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1*
Thymus	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2
Thyroïdes	1,7 ± 0,9	1,5 ± 0,4

La co-injection de Gélofusine aura permis de réduire la rétention rénale sans diminuer la fixation spécifique de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ et pourrait être une solution dans le cas où la dosimétrie de l'examen s'avèrerait être trop élevée (Tableau 22).

Tableau 22 : Résumé des conditions testées dans le but de réduire la rétention rénale du radiotracteur.

		Tag 3HIS	Gélofusine
PRC		✓	nd
Biodistribution	C57Bl/6J	X	✓
	ApoE ^{-/-}	X	nd

III.C.3 Evaluation des lots produits par PxTherapeutics.

III.C.3.1 Evaluation des lots produits par PxTherapeutics non radiomarqué (par SPR)

L'analyse des différents lots produits par Px-therapeutics a montré des affinités pour la protéine recombinante mVCAM-1 et hVCAM-1 de l'ordre du nanomolaire (Figure 101 A et B). La constante de dissociation à l'équilibre (K_d) des nouveaux lots a été trouvée équivalente à celle du lot de référence (Figure 101 B). Les résultats par SPR ont montré une affinité pour mVCAM-1 environ 3 fois plus élevée que pour hVCAM-1 ($2,30 \pm 0,04$ nM vs $7,34 \pm 0,49$ nM ; Px-2). Cette différence a été constatée à la fois sur les lots références et sur les lots Px-therapeutics.

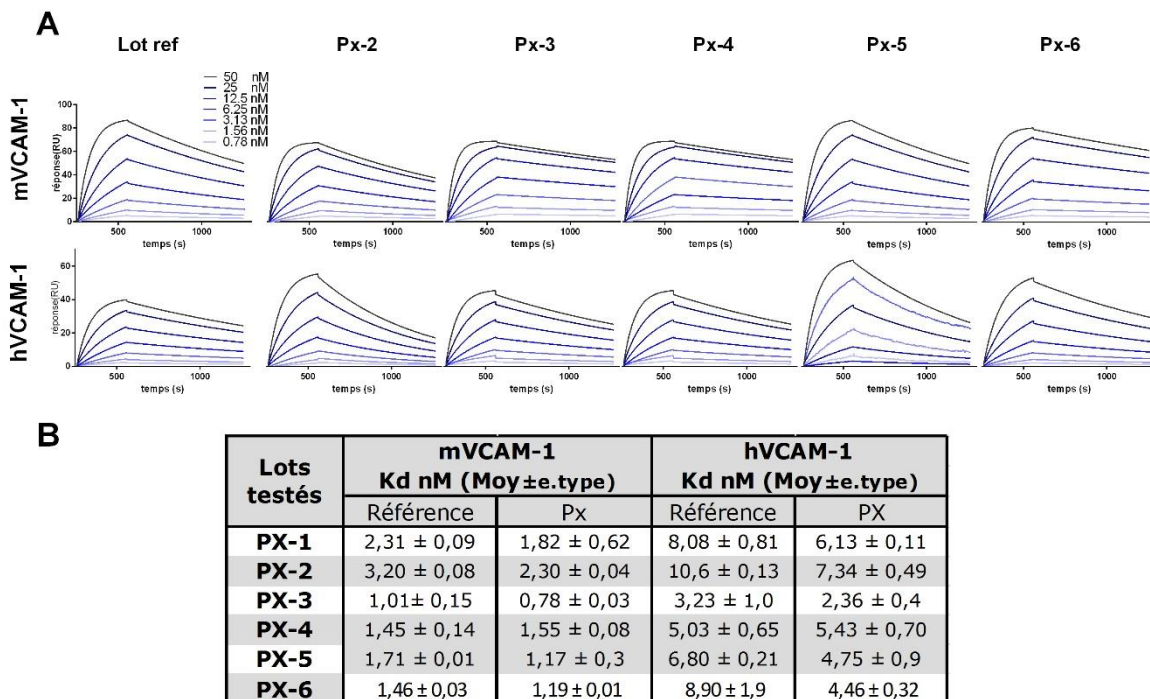


Figure 105 : Analyse par SPR de l'affinité des différents lots (nanobody anti VCAM-1) à la protéine recombinante VCAM-1 murine (mVCAM-1) et humaine (hVCAM-1). Exemple représentatif de sensorgramme permettant d'observer au cours du temps la liaison des analytes à des concentrations croissantes (0 nM à 50 nM) à mVCAM-1 et hVCAM-1 (A). Tableau résumant les constantes d'association à l'équilibre obtenues par SPR des différents lots (B). (K_d = constante de dissociation à l'équilibre).

Enfin, l'affinité du lot de référence a varié légèrement en fonction du test mais est restée de l'ordre du nanomolaire.

III.C.3.2 Evaluation des nanobodies radiomarqués au ^{99m}Tc

III.C.3.2.1 Pureté radiochimique

La pureté radiochimique des différents lots radiomarqués au ^{99m}Tc a été similaire aux lots standards avec une PRC >95% pour tous les lots testés (Tableau 23).

Tableau 23 : Pureté radiochimique déterminée par RP-HPLC réalisée à 0 et 6h après radiomarquage au ^{99m}Tc des différents lots Px. PRC>95%, PRC<95%

Temps (h)	Lots cAbVCAM1-5 testés					
	Px-1	Px-2	Px-3	Px-4	Px-5	Px-6
0	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6h	✓	✓	✓	✓	✓	✓

III.C.3.2.2 Analyse In vitro de l'affinité des différents lots de cAbVCAM1-5 produits par PxTherapeutics et radiomarqués au ^{99m}Tc

Aucune modification de l'affinité des lots cAbVCAM1-5 produits par PxTherapeutics sur la protéine recombinante VCAM-1 murine ou humaine n'a été observée en comparaison du lot initial (Tableau 24).

Tableau 24 : Analyse in vitro de l'affinité des différents lots produits par PxTherapeutics de cAbVCAM1-5 radiomarqué au ^{99m}Tc.

Protéine recombinante VCAM-1	Validation des lots testés Constantes de dissociation kd (nM)	Lots Px testés					
		Px-1	Px-2	Px-3	Px-4	Px-5	Px-6
Humaine	15<kd<35	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Murine	3<kd<10	✓	✓	✓	✓	✓	✓

A titre d'exemple, l'affinité du lot Px-6 (BPF) produit par PxTherapeutics a été comparable au lot référence radiomarqué avec le protocole de marquage initial (Figure 106).

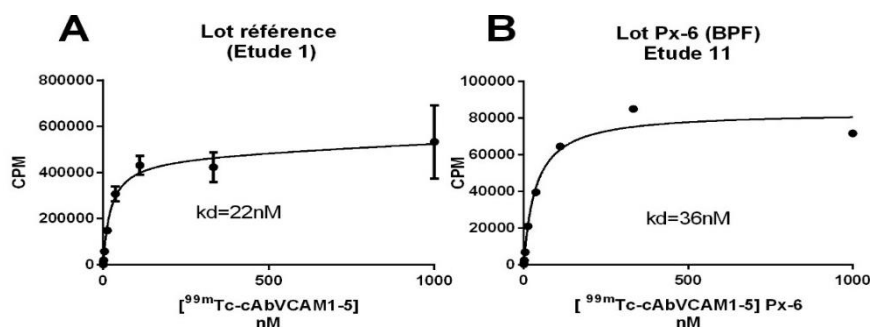


Figure 106 : Exemple représentatif de fit obtenu à partir d'un modèle ligand-récepteur permettant de déterminer les constantes de dissociation de différents lots (lot référence (A) et lot PX-6 (B), radiomarqué au ^{99m}Tc sur la protéine recombinante humaine VCAM-1.

III.C.3.2.3 Etude ex vivo par prélèvements d'organes des différents lots PX

L'évaluation de la biodistribution par prélèvements d'organes des différents lots produits par PxTherapeutics et radiomarqués au ^{99m}Tc a été réalisée 3h après injection du radiotracer chez des souris C57BL/6J (Tableau 25). En accord avec les images SPECT/CT, nous avons observé une forte rétention rénale des différents lots marqués, allant de $298,2 \pm 22,8\%$ DI/g à $331,3 \pm 86,2\%$ DI/g.

Tableau 25 : Biodistribution 3h après l'injection des différents lots radiomarqués au ^{99m}Tc chez des souris C57BL/6J âgées de 10 semaines, sous régime standard. * $P < 0,05$ vs référence.

	Lots cAbVCAM1-5					
	Initiale	Px-2	Px-3	Px-4	Px-5	Px-6 (BPF)
Etude	1	5	7	8	10	11
Effectif (n)	8	6	3	3	6	6
Dose injectée (MBq)	$56,3 \pm 8,5$	$44,0 \pm 5,3$	$55,7 \pm 15,3$	$36,4 \pm 1,4$	$36,5 \pm 6,5$	$55,7 \pm 3,2$
Aorte thoracique	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,3$
Aorte abdominale	$0,6 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$
Bile	$0,5 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$
Cerveau	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	0 ± 0	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Cœur	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0$	$0,2 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,0$
Estomac	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,0$	$0,6 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0$	$0,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
Foie	$1,1 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$
Ganglions	$3,3 \pm 0,7$	$2,4 \pm 1,0$	$4,2 \pm 1,3$	$5,2 \pm 1,8$	$4,4 \pm 1,0$	$5,4 \pm 2,3$
Glandes salivaires	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,0$
Intestin	$0,7 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
Moelle osseuse	$5,0 \pm 2,1$	$5,2 \pm 0,3$	$10,3 \pm 2,0^*$	$6,6 \pm 2,5$	$6,5 \pm 2,3$	$8,9 \pm 2,8$
Muscle	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$
Poumon	$1,8 \pm 0,5$	$1,6 \pm 0,4$	$3,1 \pm 1,7$	$3,5 \pm 3,4$	$1,7 \pm 0,4$	$2,4 \pm 1,0$
Rate	$7,7 \pm 1,0$	$6,3 \pm 0,3^*$	$6,2 \pm 0,8^*$	$9,2 \pm 1,8$	$9,1 \pm 1,4$	$9,1 \pm 1,4$
Rein	$298,2 \pm 22,8$	$317,7 \pm 39,2$	$326,1 \pm 47,0$	$328,4 \pm 14,4$	$331,3 \pm 86,2$	$323,9 \pm 19,7$
Sang	$0,3 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1^*$
Thymus	$1,4 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,7^*$	$1,6 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,3$
Thyroides	$1,3 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,9$	$1,1 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,5$

Dans l'ensemble des lots étudiés, le profil de biodistribution des différents lots a été identique, avec une captation $>2\%$ DI/g dans les ganglions lymphatiques, la

moelle osseuse et la rate qui expriment constitutivement VCAM-1 et <2% DI/g dans les autres organes à l'exception du rein. On peut noter également une faible activité sanguine, comprise entre 0,2 et 0,4% DI/g pour l'ensemble des lots testés.

Quelques différences significatives de fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 par rapport à la méthode initiale ont pu être observées, notamment une augmentation significative de l'activité sanguine du lot Px-6 BPF ($0,3 \pm 0,0\%$ DI/g vs $0,6 \pm 0,1\%$ DI/g) et une augmentation significative de la fixation du lot Px-3 dans la moelle osseuse ($5,0 \pm 2,1\%$ DI/g vs $10,3 \pm 2,0\%$ DI/g), des lots Px-2 et 3 dans la rate ($7,7 \pm 1,0\%$ DI/g vs $6,3 \pm 0,3\%$ DI/g et $6,2 \pm 0,8\%$ DI/g) et du lot Px-3 dans le thymus ($1,4 \pm 0,4\%$ DI/g vs $2,0 \pm 0,7\%$ DI/g).

III.C.3.3 Reformulation du lot clinique (étude de stabilité)

Suite à la présence de particules visibles dans le lot BPF, stocké à -70°C durant plusieurs mois, une étude de reformulation du tampon visant à stabiliser le nanobody par l'ajout d'excipient a été effectuée. Par des tests de stabilité (stress thermique et mécanique), de nombreux excipients ont été évalués par Px-therapeutics. Parmi ces excipients, seuls les polysorbates 20 et 80 ont permis d'améliorer efficacement la stabilité du nanobody. Ces deux lots nous ont été transmis afin de réaliser des tests complémentaires (radiomarquage, affinité, imagerie SPECT/CT, biodistribution) et de valider l'une des deux conditions pour le transfert en clinique.

III.C.3.3.1 PRC

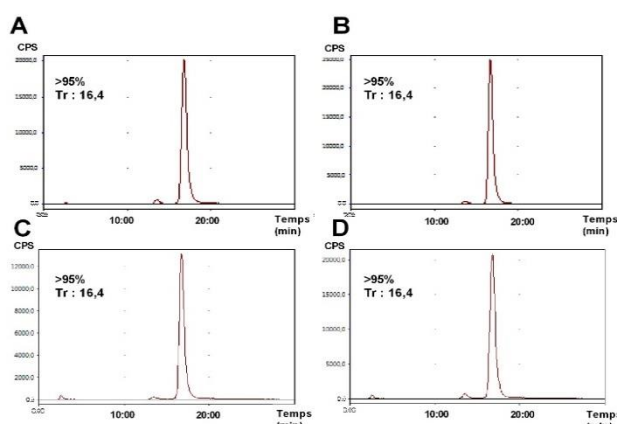


Figure 107 : Profils RP-HPLC à 0 (A et B) et 6h (C et D) après radiomarquage au ^{99m}Tc des lots PX-6 au polysorbate 20 à 0,05% (A et C) et au polysorbate 80 à 0,01% (B et D).

Les profils RP-HPLC présentés ci-dessous démontrent la bonne pureté radiochimique des différents lots radiomarqués au ^{99m}Tc et leur bonne stabilité 6h après radiomarquage, avec des PRC >95% pour toutes les conditions testées (Figure 107). Les excipients n'ont pas interféré sur le radiomarquage du nanobody au ^{99m}Tc .

III.C.3.3.2 Analyse *In vitro* de l'affinité du lot Px-6 radiomarqué au ^{99m}Tc après reformulation au polysorbate 20 à 0,05% ou au polysorbate 80 à 0,01%.

L'ajout d'agent stabilisateur tel que le polysorbate 20 ou le polysorbate 80 n'a pas modifié l'affinité des nanobody après radiomarquage. En effet, la liaison à la protéine recombinante humaine VCAM-1 des différentes conditions de reformulation testées a été similaire entre le nanobody de référence et le lot PX-6 contenant le polysorbate 80 ou 20 avec des affinités de 27,9 nM (Figure 108-A), de 29,9 nM (Figure 108-C) et de 49 nM respectivement (Figure 108-B). La légère augmentation de l'affinité mesurée pour le lot Px-6 polysorbate 20 0,05% (49 nM) n'est pas considérée comme significative. En conclusion, *in vitro*, l'ajout d'excipient n'a pas eu d'impact sur le radiomarquage de cAbVCAM1-5 sur sa liaison à VCAM-1.

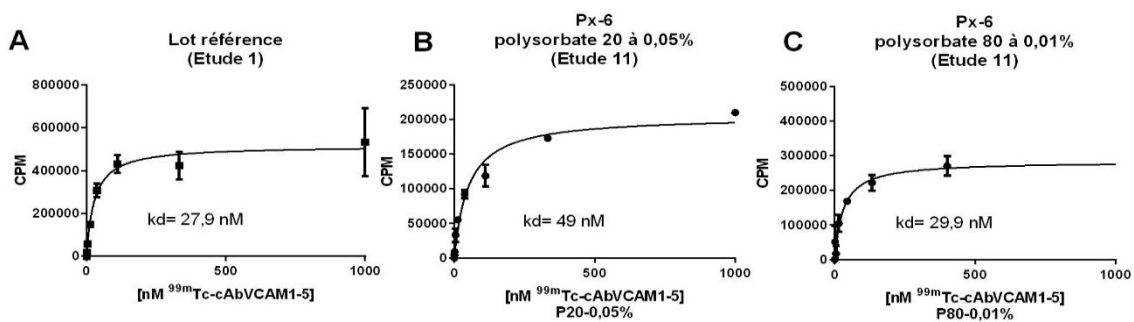


Figure 108 : Constante de dissociation déterminée à partir de fit obtenu d'un modèle ligand récepteur de la fixation spécifique des différentes conditions de reformulation testées de cAbVCAM1-5 radiomarqué au ^{99m}Tc sur la protéine recombinante humaine VCAM-1.

III.C.3.3.3 Biodistribution par prélèvements d'organes

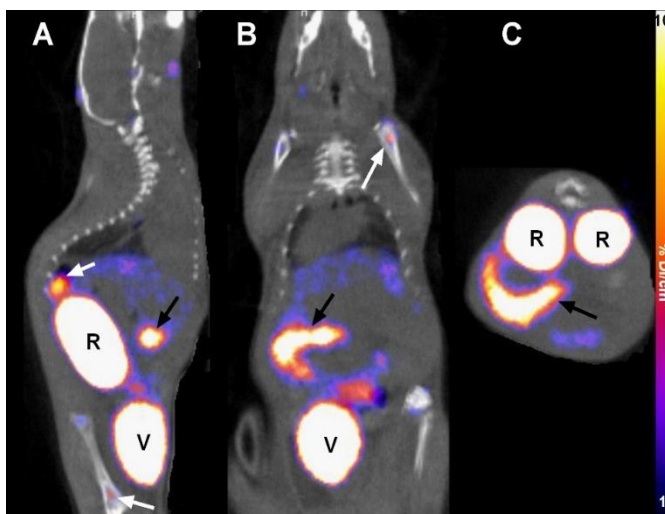


Figure 109 : Images représentatives SPECT/CT en vue sagittale (A), coronale (B) et transversale (C) d'une souris C57BL/6J, 2h après l'injection du lot PX-6 BPF (polysorbate 20 0,05%) radiomarqué au ^{99m}Tc . En plus de sa fixation au sein des organes exprimant constitutivement VCAM-1 (Flèches blanches) et de son élimination rénale, on peut observer une forte captation dans l'intestin (flèches noires). R= rein, V= vessie. Echelle min=1 et max=10% DI/cm³.

La validation des conditions de reformulation du tampon a été réalisée en biodistribution par prélèvements d'organes, 3h après l'injection du radiotracer chez des souris C57BL/6J

(Tableau 26). Ces analyses n'ont pas mis en évidence de différence dans la biodistribution de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5. Néanmoins, nous avons remarqué par imagerie SPECT/CT une fixation du nanobody stabilisé au polysorbate 20 à 0,05% (Figure 109) plus importante au niveau de la partie distale du petit intestin par rapport à la condition polysorbate 80 à 0,01%. Par conséquent, nous avons préféré poursuivre le transfert clinique de cAbVCAM1-5 avec la reformulation contenant du polysorbate 80 à 0,01%.

Tableau 26 : Biodistribution 3h après l'injection des différentes conditions de reformulation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 chez des souris C57BL/6J âgées de 10 semaines, sous régime standard. * $P < 0,05$ vs référence.

Conditions	Initiale	Px-6 polysorbate 20 0,05%	Px-6 polysorbate-80 0,01%
Etude	1	11	11
Effectif (n)	8	3	9
Dose injectée (MBq)	56,3 ± 8,5	80,4 ± 16,3	70,7 ± 9,9
Aorte thoracique	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,2
Aorte abdominale	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2
Bile	0,5 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,2
Cerveau	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Cœur	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Estomac	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Foie	1,1 ± 0,4	1,9 ± 0,4	1,1 ± 0,2
Ganglions	3,3 ± 0,7	5,9 ± 3,2	3,9 ± 1,4
Glandes salivaires	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Intestin	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,2
Moelle osseuse	5,0 ± 2,1	9,0 ± 3,2	7,8 ± 2,3
Muscle	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Poumon	1,8 ± 0,5	1,9 ± 0,0	2,0 ± 1,0
Rate	7,7 ± 1,0	7,7 ± 1,0	7,1 ± 1,5
Rein	298,2 ± 22,8	290,3 ± 12,3	309,8 ± 17,6
Sang	0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,3 ± 0,1
Thymus	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Thyroïdes	1,3 ± 0,6	0,6 ± 0,7	1,1 ± 0,7

A la suite de ces différentes études, nous avons pu déterminer les conditions optimales de radiomarquage (75°C, NaCl, 100 µg, ERAS) ainsi que le fait que l'ajout de polysorbate 80 à 0,01% ne modifiait ni le radiomarquage ni la liaison *in vitro* et *in vivo* à VCAM-1 (Tableau 27).

Tableau 27 : Résumé des conditions optimales de radiomarquage et de reformulation de cAbVCAM1-5 sélectionnés pour le transfert en clinique du nanobody.

Méthode	Température	Masse cAbVCAM1-5	Tampon	Intermédiaire tricarboneyle	Lot cAbVCAM1-5
Initiale	50°C	50 µg	PBS	PSI	LRB
Finale	75°C	100 µg	NaCl	Kit ERAS (BPF)	PX-6 BPF (polysorbate-80 0,01%)

III.C.4 Validation des paramètres sélectionnés pour le transfert en clinique

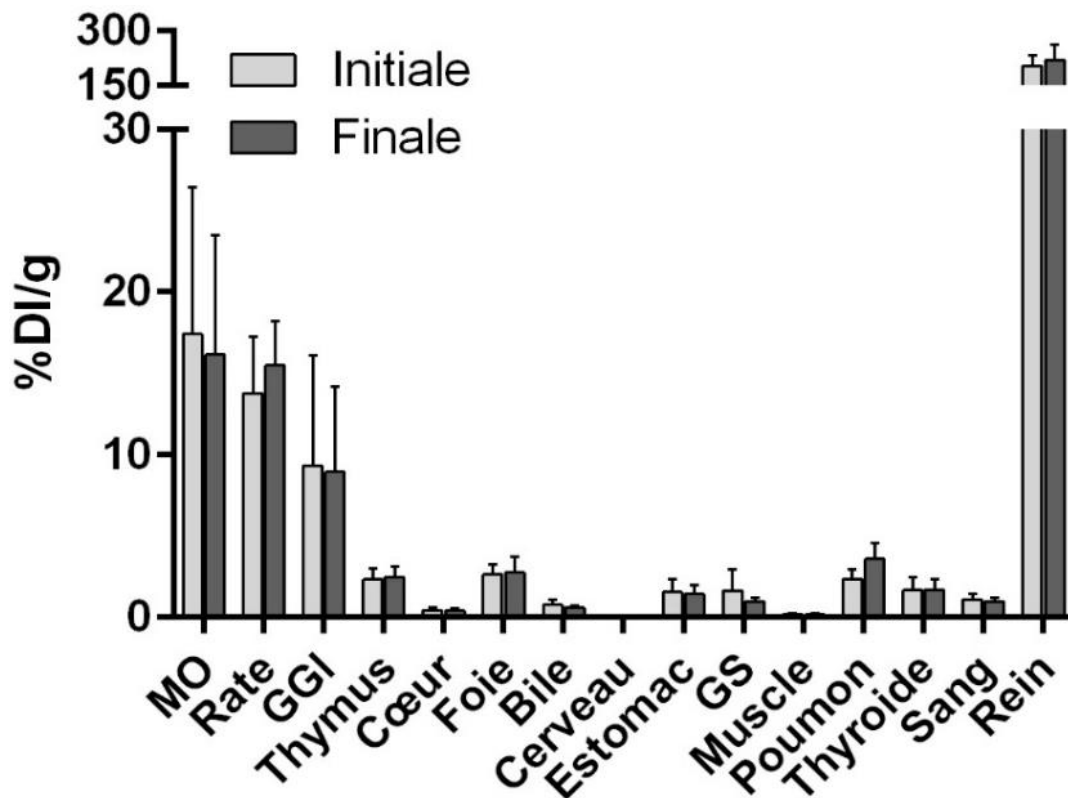


Figure 110 : Comparaison en biodistribution par prélèvements d'organes 3 h après l'injection de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 selon les paramètres finaux ou initiaux chez des souris $\text{ApoE}^{-/-}$ sous régime Western. (GGI = ganglions lymphatiques, GS = glandes salivaires, Mo= moelle osseuse).

Toutes les conditions ayant été validées, une étude a été effectuée chez des souris $\text{ApoE}^{-/-}$ sous régime Western afin de comparer la fixation dans les lésions athéromateuses de cAbVCAM1-5 radiomarqué selon les conditions de radiomarquage finales (Px-6 polysorbate 80 à 0,01%, 100 μg , ERAS labo, 75°C, NaCl) aux conditions initiales (cAbVCAM1-5 LRB, 50 μg , PSI, 50°C, PBS). Après comptage de la radioactivité au compteur gamma dans les tissus et organes prélevés, le profil de biodistribution a été similaire entre les 2 conditions (initiale vs finale) (Figure 110). La fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 au sein des organes lymphoïdes a été $>2\%$ DI/g et $<1\%$ DI/g au sein des tissus non spécifiques, à l'exception des poumons ($3,5 \pm 1,0$ % DI/g) et du foie ($2,75 \pm 1,00$ % DI/g).

De même au niveau des différents segments aortiques, les profils de biodistribution des 2 conditions étaient similaires, avec une fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 deux fois plus importantes au sein des régions présentant des lésions athéromateuses (valves et crosse aortique) en comparaison des régions saines (aorte thoracique et abdominale) (Figure 111).

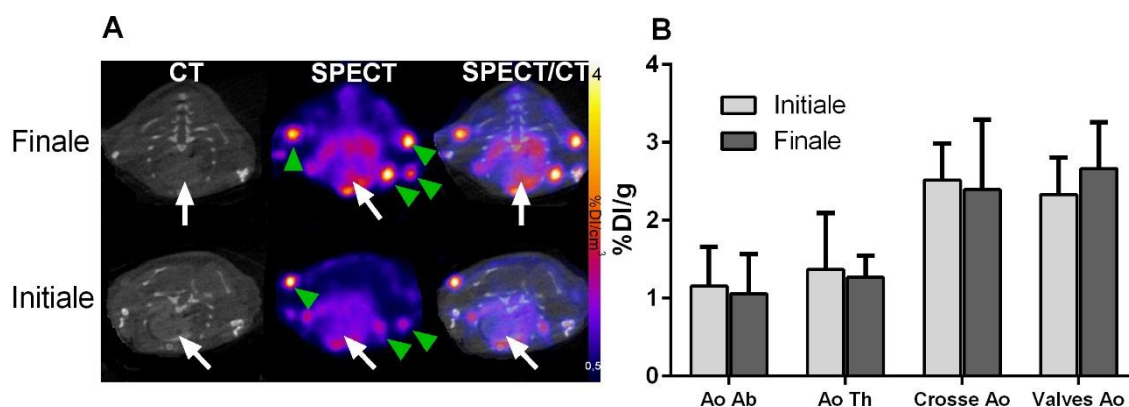


Figure 111 : Exemple représentatif d'images SPECT/CT en vue transversale centrée sur le myocarde chez des souris ApoE^{-/-} sous régime Western pendant 30 semaines, 2h après l'injection de cAbVCAM1-5 radiomarqué au ^{99m}Tc selon les conditions de radiomarquage initiales ou finales (A). Une forte fixation est visible au sein des ganglions lymphatiques (flèches vertes) et des lésions athéromateuses présentes dans l'aorte ascendante (flèches blanches). Quantification ex vivo en biodistribution par prélèvements d'organes de la fixation au sein de différents segments aortiques (sains ou avec présence de lésions athéromateuses) chez ces mêmes souris. Min 0,5 max 4% DI/cm³. Ao Ab= aorte abdominale, Ao th= aorte thoracique, crosse Ao = crosse aortique, valves Ao = valves aortiques.

Cette dernière étude effectuée chez des souris ApoE^{-/-} nous a permis de valider les conditions de marquage, l'intermédiaire tricarbonyle et cAbVCAM1-5 aux BPF dans le but de transférer ce radiotracer en clinique. Les conditions finales sont indiquées dans le tableau 28, ci-dessous.

Tableau 28 : Paramètres validés pour le transfert en clinique de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 en comparaison des paramètres initiaux utilisés en préclinique.

Méthode	Température	Masse cAbVCAM1-5	Tampon	Intermédiaire Tricarbonyle	Lot cAbVCAM1-5
Initiale	50°C	50µg	PBS	PSI	LRB
Finale	75°C	100µg	NaCl	ERAS (BPF)	PX-6 BPF (polysorbate-80 0,01%)

III.D Discussion et conclusion partie II

La recherche d'un outil diagnostique permettant l'identification des plaques d'athérome vulnérables, responsables de la majorité des événements cardiovasculaires aigus est un enjeu important pour la prise en charge des patients à risque. Actuellement, un tel outil n'existe pas. Le projet MC² a pour objectif de transférer en clinique un agent d'imagerie innovant, constitué d'un nanobody ciblant une protéine impliquée dans le processus inflammatoire de l'athérosclérose, VCAM-1. Celui-ci possède des caractéristiques optimales pour l'imagerie de l'inflammation vasculaire, notamment un faible poids moléculaire permettant d'avoir un rapport signal sur bruit important. Après avoir caractérisé complètement ce traceur en préclinique, les travaux de recherche de cette deuxième partie de thèse ont porté sur le transfert en clinique de cAbVCAM1-5.

Considéré comme un produit issu des biotechnologies, l'injection à l'homme de ce médicament expérimental nécessite de respecter de nombreuses normes imposées par les agences de santé françaises et européennes (ANSM et EMA) afin de garantir la sécurité et la qualité des médicaments mis sur le marché. Ces normes imposent notamment que la production du nanobody et de l'intermédiaire de réaction tricarbone soit réalisée selon les BPF, permettant de garantir la qualité du produit. Ces productions ont été sous traitées à 2 sociétés, certifiées aux normes des bonnes pratiques de fabrication que sont Px-therapeutics pour la production du nanobody et ERAS labo pour l'intermédiaire tricarbone.

Différentes étapes ont été nécessaires à la production de cAbVCAM1-5 au grade BPF. De l'optimisation du rendement de production, en passant par la révision des méthodes de production et de purification, toutes les modifications apportées aux processus de génération du nanobody ont été validées par différentes techniques. Avant radiomarquage, l'affinité des lots a été évaluée par SPR, sur la protéine recombinante VCAM-1 humaine et murine. Après radiomarquage, la pureté radiochimique ainsi que la stabilité ont été évaluées par RP-HPLC pour chaque lot produit. Enfin, des études de biodistribution ont été menées chez des souris C57BL/6J afin de valider la production des différents lots, ainsi que chez des souris ApoE^{-/-} pour le lot final, de grade BPF, dans le but de valider sa fixation au sein des lésions athéromateuses. La présence de particules visibles

après stockage à -70°C du lot BPF nous a contraint à réaliser une étude de reformulation du tampon, dans l'objectif de stabiliser le nanobody. Le polysorbate 80 à 0,01% et le polysorbate 20 à 0,05% se sont avérés être les excipients les plus efficaces dans le but de prévenir la formation d'agrégats. Les analyses complémentaires de mesure d'affinité, de radiomarquage et de biodistribution effectuées ont montré que le polysorbate 80 à 0,01% était le plus approprié des 2 excipients.

Parallèlement à la mise au point des procédés de production du nanobody, les méthodes analytiques nécessaires au suivi de la production de cAbVCAM1-5 et de sa caractérisation ont été développées afin d'établir des critères de spécification assurant la reproductibilité des lots et leur qualité. Ces spécifications prennent en compte entre autres le taux d'endotoxines bactériennes, la charge microbienne, mais également la pureté du lot, dont le seuil a été défini comme étant supérieur à 90%. La concentration a été déterminée par des mesures en UV, tandis que l'identification et la pureté du nanobody ont été évaluées par SDS-page, RP-HPLC et SE-UPLC.

Ce transfert en clinique a nécessité également d'adapter le protocole de radiomarquage de cAbVCAM1-5 aux normes des bonnes pratiques de préparation appliquées au sein de la radiopharmacie et en conformité avec la pharmacopée. Celles-ci ont été évaluées et validées par des mesures de pureté radiochimique, d'affinité, et de biodistribution.

Après validation des conditions de radiomarquage, de l'intermédiaire tricarbonyle et du lot cAbVCAM1-5 aux BPF par des études biologiques, l'étude de toxicologie a pu être amorcée.

Les médicaments radiopharmaceutiques expérimentaux (MRPE) injectés en micro-dose dépendent d'une réglementation allégée, nécessitant de réaliser une étude de toxicité étendue à dose unique. Le CERB, possédant la certification "bonne pratique de laboratoire" (BPL), est le prestataire en charge de réaliser l'étude de toxicité. Les doses injectées aux souris ont été déterminées à partir de données connues par le LRB sur le rendement de marquage et en se basant sur l'expérience d'utilisation en routine clinique du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA, puisque la biodistribution du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -cAbVCAM1-5 chez le petit animal met en évidence comme première cible les reins. La dose efficace a donc été estimée pour un

patient de 70 Kg entre 3,3 et 4,8 mSv pour une activité injectée entre 370 et 550 MBq. L'injection à des doses 1 000 fois supérieures à l'homme, comme recommandé par les instances, aurait nécessité des volumes d'injection du radiotracer inadaptés à des injections en bolus chez la souris. D'après les recommandations, le volume maximal injectable en bolus chez une souris est de 5 ml/kg, soit 150 µl pour une souris de 30 g. En accord avec le mode d'injection prévu en clinique, nous avons préféré réduire les quantités injectées, tout en respectant la législation qui préconise des doses à administrer supérieures à 100 fois la dose chez l'homme pour une étude de "single dose toxicity". Dans le respect des normes des bonnes pratiques de préparation, plusieurs radiomarquages de cAbVCAM1-5 au ^{99m}Tc ont été réalisées au sein de la radiopharmacie du service de médecine nucléaire du CHU de Grenoble, selon les conditions de marquage précédemment sélectionnées. Les produits obtenus ont été congelés 2 semaines, jusqu'à décroissance de la radioactivité, avant l'envoi au CERB. La qualité des échantillons a été évaluée par 2 méthodes que sont le SDS-PAGE, permettant d'identifier de possible dégradation du nanobody et la spectrométrie de masse par ESI ("ElectroSpray Ionization") rendant compte de la proportion de cAbVCAM1-5 couplé au ^{99m}Tc. Après validation de la stabilité des échantillons, 15 souris mâles et 15 souris femelles C57BL/6J ont reçu une injection intraveineuse d'un bolus du produit correspondant à une dose 300 fois supérieure à celle qui sera injectée chez l'homme. Des analyses *post-mortem* ont été effectuées à J2 et J15 afin d'explorer de possibles effets toxiques.

A l'issue des résultats de l'étude de toxicologie, le dossier du médicament expérimental comportant la partie 1 relative à la qualité pharmaceutique, chimique ou biologique du produit fini et la partie 2 correspondant aux données non cliniques obtenues à partir des études pharmacologiques et toxicologiques pourra être soumis aux autorités compétentes afin d'initier l'étude clinique de phase I/IIa. L'ANSM est en charge d'évaluer l'aspect scientifique du projet (sa conformité en termes de fabrication, pertinence de l'essai, ...) tandis que le comité de protection des personnes (CPP) est chargé d'expertiser les aspects éthiques du projet (protection des participants, les moyens, ...).

L'objectif principal de la phase I/IIa monocentrique sera d'évaluer la tolérance de la technique chez des volontaires sains et des patients avec indication d'endartériectomie carotidienne. Les objectifs secondaires porteront sur

l'évaluation de la faisabilité de la technique, de la pharmacocinétique du radiotraceur, de la dosimétrie et de l'efficacité du radiotraceur pour l'imagerie des plaques. Les 6 volontaires sains seront inclus par le centre d'investigation clinique (CIC), tandis que les 6 patients carotidiens seront inclus par le service de cardiologie et de chirurgie vasculaire. Le prélèvement d'endartériectomie nous permettra de caractériser les lésions athéromateuses par immunohistochimie et ainsi d'évaluer la corrélation entre la fixation du radiotraceur et l'expression de sa cible, VCAM-1.

L'immunogénicité du nanobody sera également évaluée par la mise en œuvre d'un test ADA (Anti-drug Antibody), basée sur la technique d'ELISA sandwich. Ces tests sont encadrés par des normes assez strictes, dont le protocole doit être décrit dans le dossier du médicament expérimental.

CONCLUSION GENERALE

Un radiotracteur permettant l'imagerie des plaques d'athérome vulnérables, dont la rupture est responsable de la majorité des infarctus du myocarde, a été développé au sein du laboratoire de radiopharmaceutiques biocliniques.

Ce radiotracteur innovant a fait l'objet d'une caractérisation complète. En effet, sa spécificité *in vivo* a été démontrée ainsi que sa sensibilité par l'utilisation de thérapies de référence (statines, ézétimibe).

Ces résultats prometteurs nous ont permis d'initier le transfert en clinique de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5, dans le cadre du projet MC² ("Molecular imaging of coronary lesions in clinical practice"), sélectionné lors de l'appel à projet PRTS 2013.

La production, la caractérisation et la validation des lots BPF de cAbVCAM1-5 ainsi que l'intermédiaire de réaction tricarbonyl ont été effectuées en parallèle de l'optimisation du protocole de radiomarquage. Ceci a été réalisé en accord avec les normes des bonnes pratiques de préparation. L'étude de toxicologie portant sur l'injection unique à une dose 300 fois supérieure à celle utilisée pour l'homme est actuellement en cours de réalisation.

A l'issue des résultats de l'étude d'innocuité chez le petit animal, une demande d'autorisation de phase d'essai clinique I/IIa sera soumise à l'ANSM sous la forme de la constitution du dossier du médicament expérimental, comportant la partie 1 et 2. La première administration à l'homme de cet agent d'imagerie innovant est prévue pour le quatrième trimestre 2018.

Références bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. 2006. *N Engl J Med.* 12.
- Abarca-Gómez, L., Z.A. Abdeen, Z.A. Hamid et al. 2017. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet.* 390:2627–2642. doi:10.1016/S0140-6736(17)32129-3.
- Abifadel, M., M. Varret, J.-P. Rabès, D. Allard, K. Ouguerram, M. Devillers, C. Cruaud, S. Benjannet, L. Wickham, D. Erlich, A. Derré, L. Villéger, M. Farnier, I. Beucler, E. Bruckert, J. Chambaz, B. Chanu, J.-M. Lecerf, G. Luc, P. Moulin, J. Weissenbach, A. Prat, M. Krempf, C. Junien, N.G. Seidah, and C. Boileau. 2003. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* 34:154–156. doi:10.1038/ng1161.
- Ackers-Johnson, M., A. Talasila, A.P. Sage, X. Long, I. Bot, N.W. Morrell, M.R. Bennett, J.M. Miano, and S. Sinha. 2015. Myocardin Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Inflammatory Activation and Disease Significance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35:817–828. doi:10.1161/ATVBAHA.114.305218.
- Adamski, P., M. Koziński, M. Ostrowska, T. Fabiszak, E. Navarese, P. Paciorek, G. Grzešek, and J. Kubica. 2014. Overview of pleiotropic effects of platelet P2Y₁₂ receptor inhibitors. *Thromb. Haemost.* 112:224–242. doi:10.1160/TH13-11-0915.
- Afek, A., E. Kogan, S. Maysel-Auslender, A. Mor, E. Regev, A. Rubinstein, G. Keren, and J. George. 2009. Clopidogrel attenuates atheroma formation and induces a stable plaque phenotype in apolipoprotein E knockout mice. *Microvasc. Res.* 77:364–369. doi:10.1016/j.mvr.2009.01.009.
- Afrasyab, A., P. Qu, Y. Zhao, K. Peng, H. Wang, D. Lou, N. Niu, and D. Yuan. 2016. Correlation of NLRP3 with severity and prognosis of coronary atherosclerosis in acute coronary syndrome patients. *Heart Vessels.* 31:1218–1229. doi:10.1007/s00380-015-0723-8.
- Agatston, A.S., W.R. Janowitz, F.J. Hildner, N.R. Zusmer, M. Viamonte, and R. Detrano. 1990. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 15:827–832. doi:10.1016/0735-1097(90)90282-T.
- Ait-Oufella, H., O. Herbin, J.-D. Bouaziz, C.J. Binder, C. Uyttenhove, L. Laurans, S. Taleb, E. Van Vré, B. Esposito, J. Vilar, J. Sirvent, J. Van Snick, A. Tedgui, T.F. Tedder, and Z. Mallat. 2010. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *J. Exp. Med.* 207:1579–1587. doi:10.1084/jem.20100155.
- Ait-Oufella, H., B.L. Salomon, S. Potteaux, A.-K.L. Robertson, P. Gourdy, J. Zoll, R. Merval, B. Esposito, J.L. Cohen, S. Fisson, R.A. Flavell, G.K. Hansson, D. Klatzmann, A. Tedgui, and Z. Mallat. 2006. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat. Med.* 12:178–180. doi:10.1038/nm1343.
- Ait-Oufella, H., S. Taleb, Z. Mallat, and A. Tedgui. 2011. Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31:969–979. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207415.
- Alpert, J.S., K. Thygesen, E. Antman, and J.P. Bassand. 2000. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36:959–969.
- Ambrose, J.A. and Barua. R.S. 2004. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43:1731-1737. doi:10.1016/j.jacc.2003.12.047

- Ariotti, S., M. van Leeuwen, S. Brugaletta, S. Leonardi, K.M. Akkerhuis, S.F. Rimoldi, G.N. Janssens, L. Ortega-Paz, U. Gianni, J.C. van den Berge, A. Karagiannis, S. Windecker, and M. Valgimigli. 2018. Effects of Ticagrelor, Prasugrel, or Clopidogrel at Steady State on Endothelial Function. *J. Am. Coll. Cardiol.* 71:1289–1291. doi:10.1016/j.jacc.2018.01.027.
- Armstrong, D., C. Summers, L. Ewart, S. Nylander, J.E. Sidaway, and J.J.J. van Giezen. 2014. Characterization of the Adenosine Pharmacology of Ticagrelor Reveals Therapeutically Relevant Inhibition of Equilibrative Nucleoside Transporter 1. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 19:209–219. doi:10.1177/1074248413511693.
- Aungraheeta, R., A. Conibear, M. Butler, E. Kelly, S. Nylander, A. Mumford, and S.J. Mundell. 2016. Inverse agonism at the P2Y₁₂ receptor and ENT1 transporter blockade contribute to platelet inhibition by ticagrelor. *Blood.* 128:2717–2728. doi:10.1182/blood-2016-03-707844.
- Baber, U., R. Mehran, S. Sartori, M.M. Schoos, H. Sillesen, P. Muntendam, M.J. Garcia, J. Gregson, S. Pocock, E. Falk, and V. Fuster. 2015. Prevalence, Impact, and Predictive Value of Detecting Subclinical Coronary and Carotid Atherosclerosis in Asymptomatic Adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* 65:1065–1074. doi:10.1016/j.jacc.2015.01.017.
- Banerjee, A. 2012. A review of family history of cardiovascular disease: risk factor and research tool. *Int. J. Clin. Pract.* 66:536–543. doi:10.1111/j.1742-1241.2012.02908.x.
- Barletta, K.E., K. Ley, and B. Mehrad. 2012. Regulation of Neutrophil Function by Adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32:856–864. doi:10.1161/ATVBAHA.111.226845.
- Barter, P., A.M. Gotto, J.C. LaRosa, J. Maroni, M. Szarek, S.M. Grundy, J.J.P. Kastelein, V. Bittner, and J.-C. Fruchart. 2007. HDL Cholesterol, Very Low Levels of LDL Cholesterol, and Cardiovascular Events. *N. Engl. J. Med.* 357:1301–1310. doi:10.1056/NEJMoa064278.
- Barua, R.S., and J.A. Ambrose. 2013. Mechanisms of Coronary Thrombosis in Cigarette Smoke Exposure. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33:1460–1467. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300154.
- Basu, S.K., M.S. Brown, Y.K. Ho, R.J. Havel, and J.L. Goldstein. 1981. Mouse macrophages synthesize and secrete a protein resembling apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:7545.
- Bauriedel, G. 1999. Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc. Res.* 41:480–488. doi:10.1016/S0008-6363(98)00318-6.
- Beer, A.J., J. Pelisek, P. Heider, A. Saraste, C. Reeps, S. Metz, S. Seidl, H. Kessler, H.-J. Wester, H.H. Eckstein, and M. Schwaiger. 2014. PET/CT Imaging of Integrin $\alpha v \beta 3$ Expression in Human Carotid Atherosclerosis. *JACC Cardiovasc. Imaging.* 7:178–187. doi:10.1016/j.jcmg.2013.12.003.
- Beer, J.H., and N. Bonetti. 2018. A COMPASS to REACH the right patients with thrombocardiology: benefits, risks, and future of the new concept. *Eur. Heart J.* 39:758–761. doi:10.1093/eurheartj/ehx702.
- Bendelac, A., N. Killeen, D. Littman, and R. Schwartz. 1994. A subset of CD4⁺ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science.* 263:1774–1778. doi:10.1126/science.7907820.
- Bennett, M.R., G.I. Evan, and S.M. Schwartz. 1995. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 95:2266–2274. doi:10.1172/JCI117917.
- Bennett, M.R., S. Sinha, and G.K. Owens. 2016. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 118:692–702. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306361.

- Binder, C.J., K. Hartvigsen, M.-K. Chang, M. Miller, D. Broide, W. Palinski, L.K. Curtiss, M. Corr, and J.L. Witztum. 2004. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 114:427–437. doi:10.1172/JCI200420479.
- Bingham, T.C., E.A. Fisher, S. Parathath, A.B. Reiss, E.S. Chan, and B.N. Cronstein. 2010. A2A adenosine receptor stimulation decreases foam cell formation by enhancing ABCA1-dependent cholesterol efflux. *J. Leukoc. Biol.* 87:683–690. doi:10.1189/jlb.0709513.
- Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. 2013. Blood pressure lowering and major cardiovascular events in people with and without chronic kidney disease: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 347:f5680–f5680. doi:10.1136/bmj.f5680.
- Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth. 2010. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature.* 464:1293–1300. doi:10.1038/nature08933.
- Bonaca, M.P., D.L. Bhatt, M. Cohen, P.G. Steg, R.F. Storey, E.C. Jensen, G. Magnani, S. Bansilal, M.P. Fish, K. Im, O. Bengtsson, T.O. Ophuis, A. Budaj, P. Theroux, M. Ruda, C. Hamm, S. Goto, J. Spinar, J.C. Nicolau, R.G. Kiss, S.A. Murphy, S.D. Wiviott, P. Held, E. Braunwald, and M.S. Sabatine. 2015. Long-Term Use of Ticagrelor in Patients with Prior Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* 372:1791–1800. doi:10.1056/NEJMoa1500857.
- Bonello, L., M. Laine, N. Kipson, J. Mancini, O. Helal, J. Fromonot, V. Gariboldi, J. Condo, F. Thuny, C. Frere, L. Camoin-Jau, F. Paganelli, F. Dignat-George, and R. Guieu. 2014. Ticagrelor Increases Adenosine Plasma Concentration in Patients With an Acute Coronary Syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63:872–877. doi:10.1016/j.jacc.2013.09.067.
- Boren, J., I. Lee, W. Zhu, K. Arnold, S. Taylor, and T.L. Innerarity. 1998. Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J. Clin. Invest.* 101:1084–1093. doi:10.1172/JCI1847.
- Bot, I., G.-P. Shi, and P.T. Kovanen. 2015. Mast Cells as Effectors in Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35:265–271. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303570.
- Braun, M., P. Pietsch, K. Schrör, G. Baumann, and S.B. Felix. 1999. Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 41:395–401.
- Brien, S.E., P.E. Ronksley, B.J. Turner, K.J. Mukamal, and W.A. Ghali. 2011. Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies. *BMJ.* 342:d636–d636. doi:10.1136/bmj.d636.
- Broisat, A., S. Hernot, J. Toczek, J. De Vos, L.M. Riou, S. Martin, M. Ahmadi, N. Thielens, U. Wernery, V. Caveliers, S. Muyltermans, T. Lahoutte, D. Fagret, C. Ghezzi, and N. Devoogdt. 2012. Nanobodies Targeting Mouse/Human VCAM1 for the Nuclear Imaging of Atherosclerotic Lesions. *Circ. Res.* 110:927–937. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.265140.
- Broisat, A., L.M. Riou, V. Ardisson, D. Boturyn, P. Dumy, D. Fagret, and C. Ghezzi. 2007. Molecular imaging of vascular cell adhesion molecule-1 expression in experimental atherosclerotic plaques with radiolabelled B2702-p. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 34:830–840. doi:10.1007/s00259-006-0310-4.
- Broisat, A., J. Toczek, L.S. Dumas, M. Ahmadi, S. Bacot, P. Perret, L. Slimani, G. Barone-Rochette, A. Soubies, N. Devoogdt, T. Lahoutte, D. Fagret, L.M. Riou, and C. Ghezzi. 2014. 99mTc-cAbVCAM1-5 Imaging Is a Sensitive and Reproducible Tool for the Detection of Inflamed Atherosclerotic Lesions in Mice. *J. Nucl. Med.* 55:1678–1684. doi:10.2967/jnumed.114.143792.
- Brook, R.D., S. Rajagopalan, C.A. Pope, J.R. Brook, A. Bhatnagar, A.V. Diez-Roux, F. Holguin, Y. Hong, R.V. Luepker, M.A. Mittleman, A. Peters, D. Siscovick, S.C. Smith, L. Whitsel, J.D. Kaufman, et al. 2010.

- Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease: An Update to the Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 121:2331–2378. doi:10.1161/CIR.0b013e3181d8e1.
- Brown, A.J., Z. Teng, P.C. Evans, J.H. Gillard, H. Samady, and M.R. Bennett. 2016. Role of biomechanical forces in the natural history of coronary atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* 13:210–220. doi:10.1038/nrcardio.2015.203.
- Buckley, C.D., D.W. Gilroy, and C.N. Serhan. 2014. Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity*. 40:315–327. doi:10.1016/j.immuni.2014.02.009.
- Budoff, M.J., D. Dowe, J.G. Jollis, M. Gitter, J. Sutherland, E. Halamert, M. Scherer, R. Bellinger, A. Martin, R. Benton, A. Delago, and J.K. Min. 2008. Diagnostic Performance of 64-Multidetector Row Coronary Computed Tomographic Angiography for Evaluation of Coronary Artery Stenosis in Individuals Without Known Coronary Artery Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52:1724–1732. doi:10.1016/j.jacc.2008.07.031.
- Burke, A.P. 2002. Morphological Predictors of Arterial Remodeling in Coronary Atherosclerosis. *Circulation*. 105:297–303. doi:10.1161/hc0302.102610.
- Burke, A.P., A. Farb, G.T. Malcom, Y. Liang, J. Smialek, and R. Virmani. 1997. Coronary Risk Factors and Plaque Morphology in Men with Coronary Disease Who Died Suddenly. *N. Engl. J. Med.* 336:1276–1282. doi:10.1056/NEJM199705013361802.
- Burke, A.P., A. Farb, G.T. Malcom, Y. Liang, J.E. Smialek, and R. Virmani. 1999. Plaque rupture and sudden death related to exertion in men with coronary artery disease. *JAMA*. 281:921–926.
- Burke, A.P., F.D. Kolodgie, A. Farb, D.K. Weber, G.T. Malcom, J. Smialek, and R. Virmani. 2001. Healed Plaque Ruptures and Sudden Coronary Death: Evidence That Subclinical Rupture Has a Role in Plaque Progression. *Circulation*. 103:934–940. doi:10.1161/01.CIR.103.7.934.
- Butcher, M.J., B.N. Gjurich, T. Phillips, and E.V. Galkina. 2012. The IL-17A/IL-17RA Axis Plays a Proatherogenic Role via the Regulation of Aortic Myeloid Cell Recruitment. *Circ. Res.* 110:675–687. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.261784.
- Calabro, P. 2003. Inflammatory Cytokines Stimulated C-Reactive Protein Production by Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circulation*. 108:1930–1932. doi:10.1161/01.CIR.0000096055.62724.C5.
- Cai, J., T.S. Hatsumakami, M.S. Fergusson, W.S. Kerwin, T. Saam, B. Chu, N. Takaya, N.L. Polissar and C. Yuan. 2005. In vivo quantitative measurement of intact fibrous cap and lipid-rich necrotic core size in atherosclerotic carotid plaque: comparison of high-resolution, contrast-enhanced magnetic resonance imaging and histology. *Circulation*. 112:3437–3444. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.528174.
- Caligiuri, G. 2002. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J. Clin. Invest.* 109:745–753. doi:10.1172/JCI200207272.
- Calvert, P.A., D.R. Obaid, M. O’Sullivan, L.M. Shapiro, D. McNab, C.G. Densem, P.M. Schofield, D. Braganza, S.C. Clarke, K.K. Ray, N.E.J. West, and M.R. Bennett. 2011. Association Between IVUS Findings and Adverse Outcomes in Patients With Coronary Artery Disease. *JACC Cardiovasc. Imaging*. 4:894–901. doi:10.1016/j.jcmg.2011.05.005.
- Canner, P.L., K.G. Berge, N.K. Wenger, J. Stamler, L. Friedman, R.J. Prineas, and W. Friedewald. 1986. Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: Long-term benefit with niacin. *J. Am. Coll. Cardiol.* 8:1245–1255. doi:10.1016/S0735-1097(86)80293-5.
- Cannon, C.P., M.A. Blazing, R.P. Giugliano, A. McCagg, J.A. White, P. Theroux, H. Darius, B.S. Lewis, T.O. Ophuis, J.W. Jukema, G.M. De Ferrari, W. Ruzyllo, P. De Lucca, K. Im, E.A. Bohula, C. Reist, S.D. Wiviott, A.M.

- Tershakovec, T.A. Musliner, E. Braunwald, R.M. Califf, and IMPROVE-IT Investigators. 2015. Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N. Engl. J. Med.* 372:2387–2397. doi:10.1056/NEJMoa1410489.
- Cannon, C.P., E. Braunwald, C.H. McCabe, D.J. Rader, J.L. Rouleau, R. Belder, S.V. Joyal, K.A. Hill, M.A. Pfeffer, A.M. Skene, and Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. 2004. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 350:1495–1504. doi:10.1056/NEJMoa040583.
- Cattaneo, M., R. Schulz and S. Nylander. 2014. Adenosine-mediated effects of ticagrelor. *J. Am. coll. Cardiol.* 63:2503-2509. doi: doi.org/10.1016/j.jacc.2014.03.031.
- Celermajer, D.S., K.E. Sorensen, D.J. Spiegelhalter, D. Georgakopoulos, J. Robinson, and J.E. Deanfield. 1994. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J. Am. Coll. Cardiol.* 24:471–476.
- Cerda, A., C.M. Fajardo, R.G. Basso, M.H. Hirata, and R.D.C. Hirata. 2014. Role of microRNAs 221/222 on Statin Induced Nitric Oxide Release in Human Endothelial Cells. *Arq. Bras. Cardiol.* doi:10.5935/abc.20140192.
- Chamberlain, J., S. Francis, Z. Brookes, G. Shaw, D. Graham, N.J. Alp, S. Dower, and D.C. Crossman. 2009. Interleukin-1 Regulates Multiple Atherogenic Mechanisms in Response to Fat Feeding. *PLoS ONE.* 4:e5073. doi:10.1371/journal.pone.0005073.
- Chapman, J.D. 1984. The detection and measurement of hypoxic cells in solid tumors. *Cancer.* 54:2441–2449. doi:10.1002/1097-0142(19841201)54:11<2441::AID-CNCR2820541122>3.0.CO;2-S.
- Chapman, M.J., H.N. Ginsberg, P. Amarengo, F. Andreotti, J. Borén, A.L. Catapano, O.S. Descamps, E. Fisher, P.T. Kovanen, J.A. Kuivenhoven, P. Lesnik, L. Masana, B.G. Nordestgaard, K.K. Ray, Z. Reiner, M.-R. Taskinen, L. Tokgözoğlu, A. Tybjærg-Hansen, G.F. Watts, and for the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. 2011. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur. Heart J.* 32:1345–1361. doi:10.1093/eurheartj/ehr112.
- Chavakis, T. 2012. Leucocyte recruitment in inflammation and novel endogenous negative regulators thereof: LEUCOCYTE RECRUITMENT. *Eur. J. Clin. Invest.* 42:686–691. doi:10.1111/j.1365-2362.2012.02677.x.
- Cheng, J.M., H.M. Garcia-Garcia, S.P.M. de Boer, I. Kardys, J.H. Heo, K.M. Akkerhuis, R.M. Oemrawsingh, R.T. van Domburg, J. Ligthart, K.T. Witberg, E. Regar, P.W. Serruys, R.-J. van Geuns, and E. Boersma. 2014. In vivo detection of high-risk coronary plaques by radiofrequency intravascular ultrasound and cardiovascular outcome: results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Eur. Heart J.* 35:639–647. doi:10.1093/eurheartj/eh484.
- Chigaev, A., and L.A. Sklar. 2012. Aspects of VLA-4 and LFA-1 regulation that may contribute to rolling and firm adhesion. *Front. Immunol.* 3. doi:10.3389/fimmu.2012.00242.
- Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. 2012. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *The Lancet.* 380:581–590. doi:10.1016/S0140-6736(12)60367-5.
- Chuluyan, H.E., T.J. Schall, T. Yoshimira, A.C. Isekutz. 1995. Il-1 activation of endothelium supports VLA-4 (CD49d/CD29)-mediated monocyte transendothelial migration to C5a, MIP-1 alpha, RANTES, and PAF but inhibits migration to MCP-1: a regulatory role for endothelium-derived MCP-1. *J. Leukoc. Biol.* 58:78-79.
- Clinton, S.K., L. Hayes, M.L. Sherman, D.W. Kufe, and P. Libby. Macrophage Colony-stimulating Factor Gene Expression in Vascular Cells and in Experimental and Human Atherosclerosis. 16.

- Collins, R., C. Reith, J. Emberson, J. Armitage, C. Baigent, L. Blackwell, R. Blumenthal, J. Danesh, G.D. Smith, D. DeMets, S. Evans, M. Law, S. MacMahon, S. Martin, B. Neal, N. Poulter, D. Preiss, P. Ridker, I. Roberts, A. Rodgers, P. Sandercock, K. Schulz, P. Sever, J. Simes, L. Smeeth, N. Wald, S. Yusuf, and R. Peto. 2016. Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *The Lancet*. 388:2532–2561. doi:10.1016/S0140-6736(16)31357-5.
- Combadiere, C., S. Potteaux, M. Rodero, T. Simon, A. Pezard, B. Esposito, R. Merval, A. Proudfoot, A. Tedgui, and Z. Mallat. 2008. Combined Inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 Abrogates Ly6Chi and Ly6Clo Monocytosis and Almost Abolishes Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Mice. *Circulation*. 117:1649–1657. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.745091.
- Conroy et al R. 2003. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur. Heart J.* 24:987–1003. doi:10.1016/S0195-668X(03)00114-3.
- Conti, P., G. Lessiani, S.K. Kritas, G. Ronconi, A. Caraffa, and T.C. Theoharides. 2017. Mast cells emerge as mediators of atherosclerosis: Special emphasis on IL-37 inhibition. *Tissue Cell*. 49:393–400. doi:10.1016/j.tice.2017.04.002.
- Cook-Mills, J.M., M.E. Marchese, and H. Abdala-Valencia. 2011. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxid. Redox Signal*. 15:1607–1638. doi:10.1089/ars.2010.3522.
- Cordes, K.R., N.T. Sheehy, M.P. White, E.C. Berry, S.U. Morton, A.N. Muth, T.-H. Lee, J.M. Miano, K.N. Ivey, and D. Srivastava. 2009. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 460:705–710. doi:10.1038/nature08195.
- Cordonnier, C., N. Sprigg, E.C. Sandset, A. Pavlovic, K.S. Sunnerhagen, V. Caso, and H. Christensen. 2017. Stroke in women — from evidence to inequalities. *Nat. Rev. Neurol.* 13:521–532. doi:10.1038/nrneurol.2017.95.
- Cosselman, K.E., A. Navas-Acien, and J.D. Kaufman. 2015. Environmental factors in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 12:627–642. doi:10.1038/nrcardio.2015.152.
- Coughlin, S.R. 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 407:258–264. doi:10.1038/35025229.
- Crea, F., and P. Libby. 2017. Acute Coronary Syndromes: The Way Forward From Mechanisms to Precision Treatment. *Circulation*. 136:1155–1166. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029870.
- Crea, F., and G. Liuzzo. 2013. Pathogenesis of acute coronary syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 61:1–11. doi:10.1016/j.jacc.2012.07.064.
- CT coronary angiography in patients with suspected angina due to coronary heart disease (SCOT-HEART): an open-label, parallel-group, multicentre trial. 2015. *The Lancet*. 385:2383–2391. doi:10.1016/S0140-6736(15)60291-4.
- Cunningham, K.S., and A.I. Gotlieb. 2005. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 85:9–23. doi:10.1038/labinvest.3700215.
- Cybulsky, M.I., C. Cheong, and C.S. Robbins. 2016. Macrophages and Dendritic Cells: Partners in Atherogenesis. *Circ. Res.* 118:637–652. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306542.
- Cybulsky, M.I., and M.A. Gimbrone. 1991. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 251:788–791.

- Cybulsky, M.I., K. Iiyama, H. Li, S. Zhu, M. Chen, M. Iiyama, V. Davis, J.-C. Gutierrez-Ramos, P.W. Connelly, and D.S. Milstone. 2001. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 107:1255–1262. doi:10.1172/JCI11871.
- Cyrus, T. 2002. Effect of Low-Dose Aspirin on Vascular Inflammation, Plaque Stability, and Atherogenesis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Circulation.* 106:1282–1287. doi:10.1161/01.CIR.0000027816.54430.96.
- D'Agostino, R.B. Primary and subsequent coronary risk appraisal: New results from The Framingham Study. 10.
- Dansky, H.M., C.B. Barlow, C. Lominska, J.L. Sikes, C. Kao, J. Weinsaft, M.I. Cybulsky, and J.D. Smith. 2001. Adhesion of Monocytes to Arterial Endothelium and Initiation of Atherosclerosis Are Critically Dependent on Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Gene Dosage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1662–1667. doi:10.1161/hq1001.096625.
- Davi, G., and C. Patrono. 2007. Platelet activation and atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.* 357:2482–2494. doi:10.1056/NEJMra071014.
- Davies, M.J., J.L. Gordon, A.J.H. Gearing, R. Pigott, N. Woolf, D. Katz, and A. Kyriakopoulos. 1993a. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J. Pathol.* 171:223–229. doi:10.1002/path.1711710311.
- Davies, M.J., P.D. Richardson, N. Woolf, D.R. Katz, and J. Mann. 1993b. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br. Heart J.* 69:377–381.
- Davies, M.J., and A. Thomas. 1984. Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N. Engl. J. Med.* 310:1137–1140. doi:10.1056/NEJM198405033101801.
- Davignon, J. 2004. Beneficial Cardiovascular Pleiotropic Effects of Statins. *Circulation.* 109:III-39-III-43. doi:10.1161/01.CIR.0000131517.20177.5a.
- Davis, H.R., D.S. Compton, L. Hoos, and G. Tetzloff. 2001. Ezetimibe, a potent cholesterol absorption inhibitor, inhibits the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:2032–2038.
- Davis, H.R., R.S. Lowe, and D.R. Neff. 2011. Effects of ezetimibe on atherosclerosis in preclinical models. *Atherosclerosis.* 215:266–278. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.010.
- De vos, J., N. Devoogdt, Lahoutte T. and S. 2013. Muyltermans. Camelid single-domain antibody fragment engineering for (pre) clinical *in vivo* molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 13:1149-60. doi: 10.1517/14712598.2013.800478.
- DeBaakey, M.E., and D.H. Glaeser. 2000. Patterns of atherosclerosis: effect of risk factors on recurrence and survival-analysis of 11,890 cases with more than 25-year follow-up. *Am. J. Cardiol.* 85:1045–1053.
- Debie, P., J.V. Quathem, I. Hansen, G. Bala, S. Massa, N. Devoogdt, C. Xavier and S. Hernot. 2017. Effect of dye and conjugation chemistry on the biodistribution profile of near-infrared-labeled nanobodies as tracers for image-guided surgery. *Mol. Pharmaceutics.* 14:1145-1153. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b01053
- Deftereos, S., G. Giannopoulos, C. Angelidis, N. Alexopoulos, G. Filippatos, N. Papoutsidakis, G. Sianos, J. Goudevenos, D. Alexopoulos, V. Pyrgakis, M.W. Cleman, A.S. Manolis, D. Tousoulis, and J. Lekakis. 2015. Anti-Inflammatory Treatment With Colchicine in Acute Myocardial Infarction: A Pilot Study. *Circulation.* 132:1395–1403. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017611.

- Demer, L.L., and Y. Tintut. 2008. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation*. 117:2938–2948. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.743161.
- Dewey, F.E., V. Gusarova, R.L. Dunbar, et al. 2017. Genetic and Pharmacologic Inactivation of ANGPTL3 and Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 377:211–221. doi:10.1056/NEJMoa1612790.
- Dewey, M., E. Zimmermann, F. Deissenrieder, M. Laule, H.-P. Dubel, P. Schlattmann, F. Knebel, W. Rutsch, and B. Hamm. 2009. Noninvasive Coronary Angiography by 320-Row Computed Tomography With Lower Radiation Exposure and Maintained Diagnostic Accuracy: Comparison of Results With Cardiac Catheterization in a Head-to-Head Pilot Investigation. *Circulation*. 120:867–875. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.859280.
- Dickens, A.M., S. Vainio, P. Marjamäki and al. 2014. Detection of microglial activation in acute model of neuroinflammation using PET and radiotracers 11C-(R)-PK11195 and 18F-GE-180. *J. Nucl. Med.* 55:466–472. doi:10.297/jnumed.113.125625.
- Dietel, B., I. Cicha, C.J. Voskens, E. Verhoeven, S. Achenbach, and C.D. Garlachs. 2013. Decreased numbers of regulatory T cells are associated with human atherosclerotic lesion vulnerability and inversely correlate with infiltrated mature dendritic cells. *Atherosclerosis*. 230:92–99. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.06.014.
- Dietrich, T., T. Hucko, C. Schneemann, M. Neumann, A. Menrad, J. Willuda, K. Atrott, D. Stibenz, E. Fleck, K. Graf, and H.D. Menssen. 2012. Local delivery of IL-2 reduces atherosclerosis via expansion of regulatory T cells. *Atherosclerosis*. 220:329–336. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.050.
- Dimastromatteo, J., A. Broisat, P. Perret, M. Ahmadi, D. Boturyn, P. Dumy, D. Fagret, L.M. Riou, and C. Ghezzi. 2013. In Vivo Molecular Imaging of Atherosclerotic Lesions in ApoE^{-/-} Mice Using VCAM-1-Specific, 99mTc-Labeled Peptidic Sequences. *J. Nucl. Med.* 54:1442–1449. doi:10.2967/jnumed.112.115675.
- Dumas, L.S. et al. Evaluation of antiatherogenic properties of ezetimibe using 3H-labeled low density lipoprotein cholesterol and 99mTc-cAbVCAM1-5 SPECT in ApoE^{-/-} mice fed a paigen diet. *J. Nucl. Med.* 58:1088–1093. doi:10.2967/jnumed.116.177279
- Dopheide, J.F., U. Sester, A. Schlitt, G. Horstick, H.J. Rupprecht, T. Münzel, and S. Blankenberg. 2007. Monocyte-derived dendritic cells of patients with coronary artery disease show an increased expression of costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 in vitro: *Coron. Artery Dis.* 18:523–531. doi:10.1097/MCA.0b013e3282eff1ad.
- Douglas, P.S., U. Hoffmann, M.R. Patel, D.B. Mark, H.R. Al-Khalidi, B. Cavanaugh, J. Cole, R.J. Dolor, C.B. Fordyce, M. Huang, M.A. Khan, A.S. Kosinski, M.W. Krucoff, V. Malhotra, M.H. Picard, J.E. Udelson, E.J. Velazquez, E. Yow, L.S. Cooper, and K.L. Lee. 2015. Outcomes of Anatomical versus Functional Testing for Coronary Artery Disease. *N. Engl. J. Med.* 372:1291–1300. doi:10.1056/NEJMoa1415516.
- Duewell, P., H. Kono, K.J. Rayner, C.M. Sirois, G. Vladimer, F.G. Bauernfeind, G.S. Abela, L. Franchi, G. Nuñez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K.A. Fitzgerald, K.L. Rock, K.J. Moore, S.D. Wright, V. Hornung, and E. Latz. 2010. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 464:1357–1361. doi:10.1038/nature08938.
- Dutta, P., F.F. Hoyer, L.S. Grigoryeva, H.B. Sager, F. Leuschner, G. Courties, A. Borodovsky, T. Novobrantseva, V.M. Ruda, K. Fitzgerald, Y. Iwamoto, G. Wojtkiewicz, Y. Sun, N. Da Silva, P. Libby, D.G. Anderson, F.K. Swirski, R. Weissleder, and M. Nahrendorf. 2015. Macrophages retain hematopoietic stem cells in the spleen via VCAM-1. *J. Exp. Med.* 212:497–512. doi:10.1084/jem.20141642.
- Dweck, M R. Davis, M K. Doris, M. Motwani, P.D. Adamson, P Slomka, D. Dey, Z.A Fayad, D.E Newby and D Berman. 2016. Imaging of coronary atherosclerosis-evolution towards new treatment strategies. *Nat Rev Cardiol.* 533-48. doi:10.1038/nrcardio.2016.79

- Edfeldt, K., J. Swedenborg, G.K. Hansson, and Z. Yan. 2018. Expression of Toll-Like Receptors in Human Atherosclerotic Lesions. 5.
- Eikelboom, J.W., S.J. Connolly, J. Bosch, et al. 2017. Rivaroxaban with or without Aspirin in Stable Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 377:1319–1330. doi:10.1056/NEJMoa1709118.
- Elam, M.B., H.N. Ginsberg, L.C. Lovato, M. Corson, J. Largay, L.A. Leiter, C. Lopez, P.J. O'Connor, M.E. Sweeney, D. Weiss, W.T. Friedewald, J.B. Buse, H.C. Gerstein, J. Probstfield, R. Grimm, F. Ismail-Beigi, D.C. Goff, J.L. Fleg, Y. Rosenberg, R.P. Byington, and for the ACCORDION Study Investigators. 2017. Association of Fenofibrate Therapy With Long-term Cardiovascular Risk in Statin-Treated Patients With Type 2 Diabetes. *JAMA Cardiol.* 2:370. doi:10.1001/jamacardio.2016.4828.
- Elites, M.J., L. Osborn, Y. Takada, C. Grouse, S. Luhowskyj, and R.R. Lobbt. VCAM-1 on Activated Endothelium Interacts with the Leukocyte Integrin VLA-4 at a Site Distinct from the VLA-4/Fibronectin Binding Site. 8.
- Endo, A., M. Kuroda, and Y. Tsujita. 1976. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot. (Tokyo).* 29:1346–1348.
- Everett, B.M., A.D. Pradhan, D.H. Solomon, N. Paynter, J. MacFadyen, E. Zaharris, M. Gupta, M. Clearfield, P. Libby, A.A.K. Hasan, R.J. Glynn, and P.M. Ridker. 2013a. Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial: A test of the inflammatory hypothesis of atherothrombosis. *Am. Heart J.* 166:199-207.e15. doi:10.1016/j.ahj.2013.03.018.
- Expert Consensus Document. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. 2013. *Rev. Esp. Cardiol. Engl. Ed.* 66:132. doi:10.1016/j.rec.2012.11.006.
- Ezzet, F., D. Wexler, P. Statkevich, T. Kosoglou, J. Patrick, L. Lipka, L. Mellars, E. Veltri, and V. Batra. 2001. The plasma concentration and LDL-C relationship in patients receiving ezetimibe. *J. Clin. Pharmacol.* 41:943–949.
- Falck-Hansen, M., C. Kassiteridi, and C. Monaco. 2013. Toll-Like Receptors in Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 14:14008–14023. doi:10.3390/ijms140714008.
- Falk, E., P.K. Shah, and V. Fuster. 1995. Coronary plaque disruption. *Circulation.* 92:657–671.
- Falk, E., H. Sillesen, P. Muntendam, and V. Fuster. 2011. The High-Risk Plaque Initiative: Primary Prevention of Atherothrombotic Events in the Asymptomatic Population. *Curr. Atheroscler. Rep.* 13:359–366. doi:10.1007/s11883-011-0193-0.
- Fayad, Z.A., V. Mani, M. Woodward, D. Kallend, M. Abt, T. Burgess, V. Fuster, C.M. Ballantyne, E.A. Stein, J.-C. Tardif, J.H.F. Rudd, M.E. Farkouh, and A. Tawakol. 2011. Safety and efficacy of dalcetrapib on atherosclerotic disease using novel non-invasive multimodality imaging (dal-PLAQUE): a randomised clinical trial. *The Lancet.* 378:1547–1559. doi:10.1016/S0140-6736(11)61383-4.
- Feil, S., B. Fehrenbacher, R. Lukowski, F. Essmann, K. Schulze-Osthoff, M. Schaller, and R. Feil. 2014. Transdifferentiation of Vascular Smooth Muscle Cells to Macrophage-Like Cells During Atherogenesis. *Circ. Res.* 115:662–667. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.304634.
- Feinberg, M.W., and K.J. Moore. 2016. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 118:703–720. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306300.
- Félétou, M., and P.M. Vanhoutte. 2006. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291:H985-1002. doi:10.1152/ajpheart.00292.2006.
- Ference, B.A., H.N. Ginsberg, I. Graham, K.K. Ray, C.J. Packard, E. Bruckert, R.A. Hegele, R.M. Krauss, F.J. Raal, H. Schunkert, G.F. Watts, J. Borén, S. Fazio, J.D. Horton, L. Masana, S.J. Nicholls, B.G. Nordestgaard, B. van

- de Sluis, M.-R. Taskinen, L. Tokgözoğlu, U. Landmesser, U. Laufs, O. Wiklund, J.K. Stock, M.J. Chapman, and A.L. Catapano. 2017. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.* 38:2459–2472. doi:10.1093/eurheartj/ehx144.
- Ference, B.A., F. Majeed, R. Penumetcha, J.M. Flack, and R.D. Brook. 2015. Effect of Naturally Random Allocation to Lower Low-Density Lipoprotein Cholesterol on the Risk of Coronary Heart Disease Mediated by Polymorphisms in NPC1L1, HMGCR, or Both. *J. Am. Coll. Cardiol.* 65:1552–1561. doi:10.1016/j.jacc.2015.02.020.
- Ference, B.A., W. Yoo, I. Alesh, N. Mahajan, K.K. Mirowska, A. Mewada, J. Kahn, L. Afonso, K.A. Williams, and J.M. Flack. 2012. Effect of long-term exposure to lower low-density lipoprotein cholesterol beginning early in life on the risk of coronary heart disease: a Mendelian randomization analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60:2631–2639. doi:10.1016/j.jacc.2012.09.017.
- Ferri, N., A. Corsini, C. Sirtori, and M. Ruscica. 2017. PPAR- α agonists are still on the rise: an update on clinical and experimental findings. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 26:593–602. doi:10.1080/13543784.2017.1312339.
- Fitzgerald, K., S. White, A. Borodovsky, B.R. Bettencourt, A. Strahs, V. Clausen, P. Wijngaard, J.D. Horton, J. Taubel, A. Brooks, C. Fernando, R.S. Kauffman, D. Kallend, A. Vaishnav, and A. Simon. 2017. A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *N. Engl. J. Med.* 376:41–51. doi:10.1056/NEJMoa1609243.
- Folco, E.J., Y. Sheikine, V.Z. Rocha, T. Christen, E. Shvartz, G.K. Sukhova, M.F. Di Carli, and P. Libby. 2011. Hypoxia But Not Inflammation Augments Glucose Uptake in Human Macrophages. *J. Am. Coll. Cardiol.* 58:603–614. doi:10.1016/j.jacc.2011.03.044.
- Fowkes, F.G.R., V. Aboyans, F.J.I. Fowkes, M.M. McDermott, U.K.A. Sampson, and M.H. Criqui. 2017. Peripheral artery disease: epidemiology and global perspectives. *Nat. Rev. Cardiol.* 14:156–170. doi:10.1038/nrcardio.2016.179.
- Fowkes, F.G.R., D. Rudan, I. Rudan, V. Aboyans, J.O. Denenberg, M.M. McDermott, P.E. Norman, U.K. Sampson, L.J. Williams, G.A. Mensah, and M.H. Criqui. 2013. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *The Lancet.* 382:1329–1340. doi:10.1016/S0140-6736(13)61249-0.
- Fractional Flow Reserve versus Angiography for Guiding Percutaneous Coronary Intervention. 2009. *N Engl J Med.* 12.
- Franchi, F., and D.J. Angiolillo. 2015. Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome. *Nat. Rev. Cardiol.* 12:30–47. doi:10.1038/nrcardio.2014.156.
- Fredman, G., J. Hellmann, J.D. Proto, G. Kuriakose, R.A. Colas, B. Dorweiler, E.S. Connolly, R. Solomon, D.M. Jones, E.J. Heyer, M. Spite, and I. Tabas. 2016a. An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques. *Nat. Commun.* 7:12859. doi:10.1038/ncomms12859.
- Fredman, G., J. Hellmann, J.D. Proto, G. Kuriakose, R.A. Colas, B. Dorweiler, E.S. Connolly, R. Solomon, D.M. Jones, E.J. Heyer, M. Spite, and I. Tabas. 2016b. An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques. *Nat. Commun.* 7:12859. doi:10.1038/ncomms12859.
- Fredman, G., and I. Tabas. 2017. Boosting Inflammation Resolution in Atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 187:1211–1221. doi:10.1016/j.ajpath.2017.01.018.

- Freigang, S., F. Ampenberger, G. Spohn, S. Heer, A.T. Shamshev, J. Kiselow, M. Hersberger, M. Yamamoto, M.F. Bachmann, and M. Kopf. 2011. Nrf2 is essential for cholesterol crystal-induced inflammasome activation and exacerbation of atherosclerosis: Innate immunity. *Eur. J. Immunol.* 41:2040–2051. doi:10.1002/eji.201041316.
- Freitas Lima, L.C., V. de A. Braga, M. do Socorro de França Silva, J. de C. Cruz, S.H. Sousa Santos, M.M. de Oliveira Monteiro, and C. de M. Balarini. 2015. Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association. *Front. Physiol.* 6. doi:10.3389/fphys.2015.00304.
- Fuster, V. 1994. Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation.* 90:2126–2146.
- Fuster, V., L. Badimon, J.J. Badimon, and J.H. Chesebro. 1992. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N. Engl. J. Med.* 326:242–250. doi:10.1056/NEJM199201233260406.
- Gaemperli, O., J. Shalhoub, D.R.J. Owen, F. Lamare, S. Johansson, N. Fouladi, A.H. Davies, O.E. Rimoldi, and P.G. Camici. 2012. Imaging intraplaque inflammation in carotid atherosclerosis with 11C-PK11195 positron emission tomography/computed tomography. *Eur. Heart J.* 33:1902–1910. doi:10.1093/eurheartj/ehr367.
- Gaffney, E.J., R.H. Clarke, A.R. Lucas, and J.M. Isner. 1989. Correlation of fluorescence emission with the plaque content and intimal thickness of atherosclerotic coronary arteries. *Lasers Surg. Med.* 9:215–228. doi:10.1002/lsm.1900090304.
- Galis, Z.S., G.K. Sukhova, M.W. Lark, and P. Libby. 1994a. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 94:2493–2503. doi:10.1172/JCI117619.
- Gao, J.-X., and A.C. Issekutz. 1996. Expression of VCAM-1 and VLA-4 dependent T-lymphocyte adhesion to dermal fibroblasts stimulated with proinflammatory cytokines. *Immunology.* 89:375–383. doi:10.1046/j.1365-2567.1996.d01-750.x.
- Gautier, E.L., T. Huby, J.L. Witztum, B. Ouzilleau, E.R. Miller, F. Saint-Charles, P. Aucouturier, M.J. Chapman, and P. Lesnik. 2009. Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation.* 119:1795–1804. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.806158.
- GBD 2015 DALYs and HALE Collaborators. 2016. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Lond. Engl.* 388:1603–1658. doi:10.1016/S0140-6736(16)31460-X.
- Gearing, A.J.H., I. Hemingway, R. Pigoit, J. Hughes, A.J. Rees, and S.J. Cashman. 1992. Soluble Forms of Vascular Adhesion Molecules, E-Selectin, ICAM-1, and VCAM-1: Pathological Significance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 667:324–331. doi:10.1111/j.1749-6632.1992.tb51633.x.
- Fässler, R and Meyer M. Consequences of lack of β 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev.* 1995-Fässler-1896-908
- Geng, Y.J., and P. Libby. 1995. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am. J. Pathol.* 147:251–266.
- Gerczuk, P.Z., and R.A. Kloner. 2012. An Update on Cardioprotection. *J. Am. Coll. Cardiol.* 59:969–978. doi:10.1016/j.jacc.2011.07.054.
- Getz, G.S., and C.A. Reardon. 2017. Natural killer T cells in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* 14:304–314. doi:10.1038/nrcardio.2017.2.

- Gille, A., D. D'Andrea, M.A. Tortorici, G. Hartel, and S.D. Wright. 2018. CSL112 (Apolipoprotein A-I [Human]) Enhances Cholesterol Efflux Similarly in Healthy Individuals and Stable Atherosclerotic Disease Patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38:953–963. doi:10.1161/ATVBAHA.118.310538.
- Gil-Pulido, J., and A. Zerneck. 2017. Antigen-presenting dendritic cells in atherosclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* 816:25–31. doi:10.1016/j.ejphar.2017.08.016.
- Gimbrone, M.A., and G. García-Cardeña. 2016. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 118:620–636. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
- Gisterå, A., A.-K.L. Robertson, J. Andersson, D.F.J. Ketelhuth, O. Ovchinnikova, S.K. Nilsson, A.M. Lundberg, M.O. Li, R.A. Flavell, and G.K. Hansson. 2018. Transforming Growth Factor- β Signaling in T Cells Promotes Stabilization of Atherosclerotic Plaques Through an Interleukin-17-Dependent Pathway. 10.
- Glagov, S., E. Weisenberg, C.K. Zarins, R. Stankunavicius, and G.J. Kolettis. 1987. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 316:1371–1375. doi:10.1056/NEJM198705283162204.
- Glass, C.K., and J.L. Witztum. 2001. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.* 104:503–516.
- Goettsch, C., M. Rauner, C. Hamann, K. Sinnigen, U. Hempel, S.R. Bornstein, and L.C. Hofbauer. 2011. Nuclear factor of activated T cells mediates oxidised LDL-induced calcification of vascular smooth muscle cells. *Diabetologia.* 54:2690–2701. doi:10.1007/s00125-011-2219-0.
- Gojova, A. 2003. Specific abrogation of transforming growth factor- signaling in T cells alters atherosclerotic lesion size and composition in mice. *Blood.* 102:4052–4058. doi:10.1182/blood-2003-05-1729.
- Goldstein, J.L., Y.K. Ho, S.K. Basu, and M.S. Brown. 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76:333–337.
- Graham, M.J., R.G. Lee, T.A. Brandt, L.-J. Tai, W. Fu, R. Peralta, R. Yu, E. Hurh, E. Paz, B.W. McEvoy, B.F. Baker, N.C. Pham, A. Digenio, S.G. Hughes, R.S. Geary, J.L. Witztum, R.M. Croke, and S. Tsimikas. 2017. Cardiovascular and Metabolic Effects of *ANGPTL3* Antisense Oligonucleotides. *N. Engl. J. Med.* 377:222–232. doi:10.1056/NEJMoa1701329.
- Granger, C.B., R.J. Goldberg, O. Dabbous, K.S. Pieper, K.A. Eagle, C.P. Cannon, F. Van, S.G. Goodman, and M.D. Flather. Predictors of Hospital Mortality in the Global Registry of Acute Coronary Events. 9. 2003. *Arch Intern Med.* 163: 2345-53. doi:10.1001/archinte.163.19.2345
- Greenwood, J.P., N. Maredia, J.F. Younger, J.M. Brown, J. Nixon, C.C. Everett, P. Bijsterveld, J.P. Ridgway, A. Radjenovic, C.J. Dickinson, S.G. Ball, and S. Plein. 2012. Cardiovascular magnetic resonance and single-photon emission computed tomography for diagnosis of coronary heart disease (CE-MARC): a prospective trial. *The Lancet.* 379:453–460. doi:10.1016/S0140-6736(11)61335-4.
- Gu, L., Y. Okada, S.K. Clinton, C. Gerard, G.K. Sukhova, P. Libby, and B.J. Rollins. 1998. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell.* 2:275–281.
- GUALANDRI, V., Guid. FRANCESCHINI, C.R. SIRTORI, G. GIANFRANCESCHI, Gi.B. ORSINI, A. CERRONE, and A. MENOTTI. AIMilano Apoprotein Identification of the Complete Kindred and Evidence of a Dominant Genetic Transmission. 15.
- Gupta, S., A.M. Pablo, X. Jiang, N. Wang, A.R. Tall, and C. Schindler. IFN- γ Potentiates Atherosclerosis in ApoE Knock-out Mice. 10.

- Haba, T., H. Mabuchi, A. Yoshimura, A. Watanabe, T. Wakasugi, R. Tatami, K. Ueda, R. Ueda, T. Kametani, J. Koizumi, S. Miyamoto, R. Takeda, and H. Takeshita. 1981. Effects of ML-236B (Compactin) on Sterol Synthesis and Low Density Lipoprotein Receptor Activities in Fibroblasts of Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.* 67:1532–1540.
- Helberg, S., H. Liljenbäck, O. Eskola and al. 2018. Positron emission tomography imaging of macrophages in atherosclerosis with 18F-GE-180, a radiotracer for translocator protein (TSPO). *Cont media and mol imaging.* doi:10.1155/2018/9186902.
- Hamers-Casterman, C, T.Atarhouch, S.Muyldermans, G.Robinson, C.Hamers, E.B.Songa, N.Bendahman, R.Hamers. 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 363:446-8.
- Hansson, G.K., J. Holm, and L. Jonasson. Detection of Activated T Lymphocytes in the Human Atherosclerotic Plaque. 7.
- Hansson, G.K., and P. Libby. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 6:508–519. doi:10.1038/nri1882.
- Haq, I.U., L.E. Ramsay, W.W. Yeo, P.R. Jackson, and E.J. Wallis. 1999. Is the Framingham risk function valid for northern European populations? A comparison of methods for estimating absolute coronary risk in high risk men. *Heart.* 81:40–46. doi:10.1136/hrt.81.1.40.
- Hara, T., D. Fukuda, K. Tanaka, Y. Higashikuni, Y. Hirata, S. Nishimoto, S. Yagi, H. Yamada, T. Soeki, T. Wakatsuki, M. Shimabukuro, and M. Sata. 2015. Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 242:639–646. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.023.
- Harmen, M.M., and H.J. De Haard. 2007. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:13–22. doi:10.1007/s00253-007-1142-2.
- Hartwig, H., C. Silvestre Roig, M. Daemen, E. Lutgens, and O. Soehnlein. 2015. Neutrophils in atherosclerosis. A brief overview. *Hamostaseologie.* 35:121–127. doi:10.5482/HAMO-14-09-0040.
- Haseeb, S., B. Alexander, and A. Baranchuk. 2017. Wine and Cardiovascular Health: A Comprehensive Review. *Circulation.* 136:1434–1448. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030387.
- Haskó, G., J. Linden, B. Cronstein, and P. Pacher. 2008. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7:759–770. doi:10.1038/nrd2638.
- Hastings, N.E., R.E. Feaver, M.Y. Lee, B.R. Wamhoff, and B.R. Blackman. 2009. Human IL-8 Regulates Smooth Muscle Cell VCAM-1 Expression in Response to Endothelial Cells Exposed to Atheroprone Flow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29:725–731. doi:10.1161/ATVBAHA.109.184382.
- Heidenreich, P.A., J.G. Trogon, O.A. Khavjou, J. Butler, K. Dracup, M.D. Ezekowitz, E.A. Finkelstein, Y. Hong, S.C. Johnston, A. Khera, D.M. Lloyd-Jones, S.A. Nelson, G. Nichol, D. Orenstein, P.W.F. Wilson, Y.J. Woo. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation.* 123:933–944. doi:10.1161/CIR.0b013e31820a55f5.
- Heitzer, T. 2006. Clopidogrel Improves Systemic Endothelial Nitric Oxide Bioavailability in Patients With Coronary Artery Disease: Evidence for Antioxidant and Antiinflammatory Effects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26:1648–1652. doi:10.1161/01.ATV.0000225288.74170.dc.
- Helgadottir, A., S. Gretarsdottir, G. Thorleifsson, et al. 2016. Variants with large effects on blood lipids and the role of cholesterol and triglycerides in coronary disease. *Nat. Genet.* 48:634–639. doi:10.1038/ng.3561.

- Hoffman, E.J., S.C. Huang and M.E. Phelps. 1979. Quantification in positron emission computed tomography: 1. Effect of object size. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 3:299-308
- Holmes, M.V., C.E. Dale, et al. 2014. Association between alcohol and cardiovascular disease: Mendelian randomisation analysis based on individual participant data. *BMJ.* 349:g4164–g4164. doi:10.1136/bmj.g4164.
- Hong, C., C.R. Becker, U.J. Schoepf, B. Ohnesorge, R. Bruening, and M.F. Reiser. 2002. Coronary Artery Calcium: Absolute Quantification in Nonenhanced and Contrast-enhanced Multi-Detector Row CT Studies. *Radiology.* 223:474–480. doi:10.1148/radiol.2232010919.
- Hoshino, K., H. Tsutsui, T. Kawai, K. Takeda, K. Nakanishi, Y. Takeda, and S. Akira. 1999. Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 162:5041–5044.
- Hovingh, G.K., L.P. Smits, C. Stefanutti, H. Soran, S. Kwok, J. de Graaf, D. Gaudet, C.H. Keyserling, H. Klepp, J. Frick, J.F. Paolini, J.-L. Dasseux, J.J.P. Kastelein, and E.S. Stroes. 2015. The effect of an apolipoprotein A-I-containing high-density lipoprotein-mimetic particle (CER-001) on carotid artery wall thickness in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Am. Heart J.* 169:736-742.e1. doi:10.1016/j.ahj.2015.01.008.
- Hu, S., Y. Zhu, Y. Zhang, J. Dai, L. Li, H. Dauerman, T. Soeda, Z. Wang, H. Lee, C. Wang, C. Zhe, Y. Wang, G. Zheng, S. Zhang, H. Jia, B. Yu, and I. Jang. 2017. Management and Outcome of Patients With Acute Coronary Syndrome Caused by Plaque Rupture Versus Plaque Erosion: An Intravascular Optical Coherence Tomography Study. *J. Am. Heart Assoc.* 6:e004730. doi:10.1161/JAHA.116.004730.
- Huo, Y., A. Schober, S.B. Forlow, D.F. Smith, M.C. Hyman, S. Jung, D.R. Littman, C. Weber, and K. Ley. 2003a. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat. Med.* 9:61–67. doi:10.1038/nm810.
- Huo, Y., A. Schober, S.B. Forlow, D.F. Smith, M.C. Hyman, S. Jung, D.R. Littman, C. Weber, and K. Ley. 2003b. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat. Med.* 9:61–67. doi:10.1038/nm810.
- Hutcheson, J.D., C. Goettsch, S. Bertazzo, N. Maldonado, J.L. Ruiz, W. Goh, K. Yabusaki, T. Faits, C. Bouten, G. Franck, T. Quillard, P. Libby, M. Aikawa, S. Weinbaum, and E. Aikawa. 2016. Genesis and growth of extracellular-vesicle-derived microcalcification in atherosclerotic plaques. *Nat. Mater.* 15:335–343. doi:10.1038/nmat4519.
- Hyafil, F., J. Pelisek, I. Laitinen, M. Schottelius, M. Mohring, Y. Döring, E.P.C. van der Vorst, M. Kallmayer, K. Steiger, A. Poschenrieder, J. Notni, J. Fischer, C. Baumgartner, C. Rischpler, S.G. Nekolla, C. Weber, H.-H. Eckstein, H.-J. Wester, and M. Schwaiger. 2017. Imaging the Cytokine Receptor CXCR4 in Atherosclerotic Plaques with the Radiotracer ⁶⁸ Ga-Pentixafor for PET. *J. Nucl. Med.* 58:499–506. doi:10.2967/jnumed.116.179663.
- Hynes, R.O. 2011. Metastatic Cells Will Take Any Help They Can Get. *Cancer Cell.* 20:689–690. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.022.
- Ibanez, B., S. James, S. Agewall, et al. 2018. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevationThe Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 39:119–177. doi:10.1093/eurheartj/ehx393.
- Ibanez, B., G. Vilahur, G. Cimmino, W.S. Speidl, A. Pinero, B.G. Choi, M.U. Zafar, C.G. Santos-Gallego, B. Krause, L. Badimon, V. Fuster, and J.J. Badimon. 2008. Rapid Change in Plaque Size, Composition, and Molecular Footprint After Recombinant Apolipoprotein A-IMilano (ETC-216) Administration. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51:1104–1109. doi:10.1016/j.jacc.2007.09.071.

- Iiyama, K., L. Hajra, M. Iiyama, H. Li, M. DiChiara, B.D. Medoff, and M.I. Cybulsky. 1999. Patterns of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Rabbit and Mouse Atherosclerotic Lesions and at Sites Predisposed to Lesion Formation. *Circ. Res.* 85:199–207. doi:10.1161/01.RES.85.2.199.
- Inaba, S., G.S. Mintz, A.P. Burke, G.W. Stone, R. Virmani, M. Matsumura, R. Parvataneni, R. Puri, S.J. Nicholls, and A. Maehara. 2017. Intravascular Ultrasound and Near-Infrared Spectroscopic Characterization of Thin-Cap Fibroatheroma. *Am. J. Cardiol.* 119:372–378. doi:10.1016/j.amjcard.2016.10.031.
- Inazu, A., M.L. Brown, C.B. Hesler, L.B. Agellon, J. Koizumi, K. Takata, Y. Maruhama, H. Mabuchi and A.R. Tall. 1990. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N. Eng. J. Med.* 323:1234-1238. doi:10.1056/NEJM199011013231803.
- Inflammation, Aspirin, and the Risk of Cardiovascular Disease in Apparently Healthy Men. *N. Engl. J. Med.* 7.
- Information, N.C. for B., U.S.N.L. of M. 8600 R. Pike, B. MD, and 20894 Usa. 1978. Virus-induced atherosclerosis. *J. Exp. Med.* 148:335.
- Ionita, M.G., P. van den Borne, L.M. Catanzariti, F.L. Moll, J.-P.P.M. de Vries, G. Pasterkamp, A. Vink, and D.P.V. de Kleijn. 2010. High Neutrophil Numbers in Human Carotid Atherosclerotic Plaques Are Associated With Characteristics of Rupture-Prone Lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30:1842–1848. doi:10.1161/ATVBAHA.110.209296.
- Jaffer, F.A., C. Vinegoni, M.C. John, E. Aikawa, H.K. Gold, A.V. Finn, V. Ntziachristos, P. Libby, and R. Weissleder. 2008. Real-Time Catheter Molecular Sensing of Inflammation in Proteolytically Active Atherosclerosis. *Circulation.* 118:1802–1809. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.785881.
- Jarcho, J.A., and J.F. Keaney. 2015. Proof That Lower Is Better — LDL Cholesterol and IMPROVE-IT. *N. Engl. J. Med.* 372:2448–2450. doi:10.1056/NEJMe1507041.
- Jenkins, W.S.A., A.T. Vesey, C. Stirrat, M. Connell, C. Lucatelli, A. Neale, C. Moles, A. Vickers, A. Fletcher, T. Pawade, I. Wilson, J.H.F. Rudd, E.J.R. van Beek, S. Mirsadraee, M.R. Dweck, and D.E. Newby. 2017. Cardiac $\alpha_v \beta_3$ integrin expression following acute myocardial infarction in humans. *Heart.* 103:607–615. doi:10.1136/heartjnl-2016-310115.
- Jeong, H.S., S.J. Hong, S.-A. Cho, J.-H. Kim, J.Y. Cho, S.H. Lee, H.J. Joo, J.H. Park, C.W. Yu, and D.-S. Lim. 2017. Comparison of Ticagrelor Versus Prasugrel for Inflammation, Vascular Function, and Circulating Endothelial Progenitor Cells in Diabetic Patients With Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndrome Requiring Coronary Stenting. *JACC Cardiovasc. Interv.* 10:1646–1658. doi:10.1016/j.jcin.2017.05.064.
- Jernberg, T., P. Hasvold, M. Henriksson, H. Hjelm, M. Thuresson, and M. Janzon. 2015. Cardiovascular risk in post-myocardial infarction patients: nationwide real world data demonstrate the importance of a long-term perspective. *Eur. Heart J.* 36:1163–1170. doi:10.1093/eurheartj/ehu505.
- Jia, H., F. Abtahian, A.D. Aguirre, S. Lee, S. Chia, H. Lowe, K. Kato, T. Yonetsu, R. Vergallo, S. Hu, J. Tian, H. Lee, S.-J. Park, Y.-S. Jang, O.C. Raffel, K. Mizuno, S. Uemura, T. Itoh, T. Kakuta, S.-Y. Choi, H.L. Dauerman, A. Prasad, C. Toma, I. McNulty, S. Zhang, B. Yu, V. Fuster, J. Narula, R. Virmani, and I.-K. Jang. 2013a. In Vivo Diagnosis of Plaque Erosion and Calcified Nodule in Patients With Acute Coronary Syndrome by Intravascular Optical Coherence Tomography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62:1748–1758. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.071.
- Jia, H., J. Dai, J. Hou, L. Xing, L. Ma, H. Liu, M. Xu, Y. Yao, S. Hu, E. Yamamoto, H. Lee, S. Zhang, B. Yu, and I.-K. Jang. 2016. Effective anti-thrombotic therapy without stenting: intravascular optical coherence tomography-based management in plaque erosion (the EROSION study). *Eur. Heart J.* ehw381. doi:10.1093/eurheartj/ehw381.

- Jonasson, L., J. Holm, O. Skalli, G. Bondjers, and G.K. Hansson. 1986. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 6:131–138. doi:10.1161/01.ATV.6.2.131.
- Joseph, P., and A. Tawakol. 2016. Imaging atherosclerosis with positron emission tomography. *Eur. Heart J.* 37:2974–2980. doi:10.1093/eurheartj/ehw147.
- Joshi, F.R., R. Manavaki, T.D. Fryer, N.L. Figg, J.C. Sluimer, F.I. Aigbirhio, A.P. Davenport, P.J. Kirkpatrick, E.A. Warburton, and J.H.F. Rudd. 2017. Vascular Imaging With 18 F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Is Influenced by Hypoxia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69:1873–1874. doi:10.1016/j.jacc.2017.01.050.
- Jousilahti, P., T. Laatikainen, M. Peltonen, K. Borodulin, S. Männistö, A. Jula, V. Salomaa, K. Harald, P. Puska, and E. Vartiainen. 2016. Primary prevention and risk factor reduction in coronary heart disease mortality among working aged men and women in eastern Finland over 40 years: population based observational study. *BMJ.* 352:i721.
- Kaartinen, M., A. Penttila, and P.T. Kovanen. 1994. Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture. *Circulation.* 90:1669–1678. doi:10.1161/01.CIR.90.4.1669.
- Kahn, S.E., M.E. Cooper, and S. Del Prato. 2014. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet.* 383:1068–1083. doi:10.1016/S0140-6736(13)62154-6.
- Kannel, W.B, T.R. Dawber, A.Kagan, N.Revotskie et al. 1961. Factor of risk in the development of coronary heart disease--six years follow up experience. The framingham study. *Ann Intern Med.* 55:33-50
- Kapustin, A.N., J.D. Davies, J.L. Reynolds, R. McNair, G.T. Jones, A. Sidibe, L.J. Schurgers, J.N. Skepper, D. Proudfoot, M. Mayr, and C.M. Shanahan. 2011. Calcium Regulates Key Components of Vascular Smooth Muscle Cell-Derived Matrix Vesicles to Enhance Mineralization. *Circ. Res.* 109:e1–e12. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.238808.
- Karagiannis, A.D., M. Liu, P.P. Toth, S. Zhao, D.K. Agrawal, P. Libby, and Y.S. Chatzizisis. 2018. Pleiotropic Anti-atherosclerotic Effects of PCSK9 Inhibitors From Molecular Biology to Clinical Translation. *Curr. Atheroscler. Rep.* 20. doi:10.1007/s11883-018-0718-x.
- Kearney, P.M., M. Whelton, K. Reynolds, P. Muntner, P.K. Whelton, and J. He. 2005. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. 365:7.
- Kelly-Arnold, A., N. Maldonado, D. Laudier, E. Aikawa, L. Cardoso, and S. Weinbaum. 2013. Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110:10741–10746. doi:10.1073/pnas.1308814110.
- Ketelhuth, D., and G. Hansson. 2011. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: Break of tolerance in the artery wall. *Thromb. Haemost.* 106:779–786. doi:10.1160/TH11-05-0321.
- Keyaerts, M., C. Xavier, J. Heemskerk, N. Devoogdt, H. Everaert, C. Ackaert, M. Vanhoeij, F.P. Duhoux, T. Gevaert, P. Simon, D. Schallier, C. Fontaine, I. Vaneycken, C. Vanhove, J. De Greve, J. Lamote, V. Caveliers, and T. Lahoutte. 2016. Phase I Study of 68Ga-HER2-Nanobody for PET/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Carcinoma. *J. Nucl. Med.* 57:27–33. doi:10.2967/jnumed.115.162024.
- Khanicheh, E., M. Mitterhuber, L. Xu, S.P. Haeuselmann, G.M. Kuster, and B.A. Kaufmann. 2013. Noninvasive Ultrasound Molecular Imaging of the Effect of Statins on Endothelial Inflammatory Phenotype in Early Atherosclerosis. *PLoS ONE.* 8:e58761. doi:10.1371/journal.pone.0058761.

- Khera, S., D. Kolte, T. Gupta, K.S. Subramanian, N. Khanna, W.S. Aronow, C. Ahn, R.J. Timmermans, H.A. Cooper, G.C. Fonarow, W.H. Frishman, J.A. Panza, and D.L. Bhatt. 2015. Temporal Trends and Sex Differences in Revascularization and Outcomes of ST-Segment Elevation Myocardial Infarction in Younger Adults in the United States. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66:1961–1972. doi:10.1016/j.jacc.2015.08.865.
- Kietselaer, B.L.J.H., C.P.M. Reutelingsperger, G.A.K. Heidendal, M.J.A.P. Daemen, W.H. Mess, L. Hofstra, and J. Narula. 2004. Noninvasive Detection of Plaque Instability with Use of Radiolabeled Annexin A5 in Patients with Carotid-Artery Atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 350:1472–1473. doi:10.1056/NEJM200404013501425.
- Kirij, H. 2003. Lack of Interleukin-1beta Decreases the Severity of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:656–660. doi:10.1161/01.ATV.0000064374.15232.C3.
- Kjærgaard, K.A., M.K. Christiansen, M. Schmidt, M.S. Olsen, and H.K. Jensen. 2017. Long-Term Cardiovascular Risk in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Relatives Identified by Cascade Screening. *J. Am. Heart Assoc.* 6. doi:10.1161/JAHA.116.005435.
- Kolodgie, F.D., H.K. Gold, A.P. Burke, D.R. Fowler, H.S. Kruth, D.K. Weber, A. Farb, L.J. Guerrero, M. Hayase, R. Kutys, J. Narula, A.V. Finn, and R. Virmani. 2003. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N. Engl. J. Med.* 349:2316–2325. doi:10.1056/NEJMoa035655.
- Koltsova, E.K., Z. Garcia, G. Chodaczek, M. Landau, S. McArdle, S.R. Scott, S. von Vietinghoff, E. Galkina, Y.I. Miller, S.T. Acton, and K. Ley. 2012. Dynamic T cell–APC interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 122:3114–3126. doi:10.1172/JCI61758.
- Kono, H., and K.L. Rock. 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* 8:279–289. doi:10.1038/nri2215.
- Koupenova, M., L. Clancy, H.A. Corkrey, and J.E. Freedman. 2018. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ. Res.* 122:337–351. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310795.
- Koyama, H., E.W. Raines, K.E. Bornfeldt, J.M. Roberts, and R. Ross. 1996. Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell.* 87:1069–1078.
- Koziorowski, J., M. Behe, C. Decristoforo, J. Ballinger, P. Elsinga, V. Ferrari, P. Kolenc Peitl, S. Todde, and T.L. Mindt. 2017. Position paper on requirements for toxicological studies in the specific case of radiopharmaceuticals. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* 1. doi:10.1186/s41181-016-0004-6.
- Kozyraki, R., J. Fyfe, P.J. Verroust, C. Jacobsen, A. Dautry-Varsat, J. Gburek, T.E. Willnow, E.I. Christensen, and S.K. Moestrup. 2001. Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:12491–12496. doi:10.1073/pnas.211291398.
- Kramer, M.C.A., S.Z.H. Rittersma, R.J. de Winter, E.R. Ladich, D.R. Fowler, Y.-H. Liang, R. Kutys, N. Carter-Monroe, F.D. Kolodgie, A.C. van der Wal, and R. Virmani. 2010. Relationship of thrombus healing to underlying plaque morphology in sudden coronary death. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55:122–132. doi:10.1016/j.jacc.2009.09.007.
- Kubo, T., T. Shinke, T. Okamura, K. Hibi, G. Nakazawa, Y. Morino, J. Shite, T. Fusazaki, H. Otake, K. Kozuma, T. Ioji, H. Kaneda, T. Serikawa, T. Kataoka, H. Okada, T. Akasaka, and OPINION Investigators. 2017. Optical frequency domain imaging vs. intravascular ultrasound in percutaneous coronary intervention (OPINION trial): one-year angiographic and clinical results. *Eur. Heart J.* 38:3139–3147. doi:10.1093/eurheartj/ehx351.
- Kuchan, M.J., and J.A. Frangos. 1994. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 266:C628–C636. doi:10.1152/ajpcell.1994.266.3.C628.

- Kume, T., T. Akasaka, T. Kawamoto, N. Watanabe, E. Toyota, Y. Neishi, R. Sukmawan, Y. Sadahira, and K. Yoshida. 2006. Assessment of Coronary Arterial Plaque by Optical Coherence Tomography. *Am. J. Cardiol.* 97:1172–1175. doi:10.1016/j.amjcard.2005.11.035.
- Kusters, P.J.H., E. Lutgens, and T.T.P. Seijkens. 2018. Exploring immune checkpoints as potential therapeutic targets in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 114:368–377. doi:10.1093/cvr/cvx248.
- Kwee, L., D.K. Burns, J.M. Rumberger and al. 1995. Creation and characterization of E-selectin and VCAM-1 deficient mice. *Ciba. Found. Symp.* 189:17-28.
- Kyaw, T., C. Tay, A. Khan, V. Dumouchel, A. Cao, K. To, M. Kehry, R. Dunn, A. Agrotis, P. Tipping, A. Bobik, and B.-H. Toh. 2010. Conventional B2 B Cell Depletion Ameliorates whereas Its Adoptive Transfer Aggravates Atherosclerosis. *J. Immunol.* 185:4410–4419. doi:10.4049/jimmunol.1000033.
- Landlinger, C., M.G. Pouwer, C. Juno, J.W.A. van der Hoorn, E.J. Pieterman, J.W. Jukema, G. Staffler, H.M.G. Princen, and G. Galabova. 2017. The AT04A vaccine against proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces total cholesterol, vascular inflammation, and atherosclerosis in APOE*3Leiden.CETP mice. *Eur. Heart J.* 38:2499–2507. doi:10.1093/eurheartj/ehx260.
- Lee, G.-L., Y.-W. Chang, J.-Y. Wu, M.-L. Wu, K.K. Wu, S.-F. Yet, and C.-C. Kuo. 2012. TLR 2 Induces Vascular Smooth Muscle Cell Migration Through cAMP Response Element-Binding Protein-Mediated Interleukin-6 Production. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32:2751–2760. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300302.
- Lee, J.M., J.-I. Bang, B.-K. Koo, D. Hwang, J. Park, J. Zhang, T. Yaliang, M. Suh, J.C. Paeng, Y. Shiono, T. Kubo, and T. Akasaka. 2017. Clinical Relevance of ¹⁸F-Sodium Fluoride Positron-Emission Tomography in Noninvasive Identification of High-Risk Plaque in Patients With Coronary Artery Disease. *Clinical Perspective. Circ. Cardiovasc. Imaging.* 10:e006704. doi:10.1161/CIRCIMAGING.117.006704.
- Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75:843–854.
- Lefrançois, E., G. Ortiz-Muñoz, A. Caudrillier, B. Mallavia, F. Liu, D.M. Sayah, E.E. Thornton, M.B. Headley, T. David, S.R. Coughlin, M.F. Krummel, A.D. Leavitt, E. Passegué, and M.R. Looney. 2017. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature.* 544:105–109. doi:10.1038/nature21706.
- Lenter, M., H. UHLIGt, A. HAMANNt, P. JENOt, and B. IMHOF. 1993. A monoclonal antibody against an activation epitope on mouse integrin chain 181 blocks adhesion of lymphocytes to the endothelial integrin 06.13. *Proc Natl Acad Sci USA.* 5.
- Lenting, P.J., and F. Adam. 2012. 3-4. Regulating interactions between von Willebrand factor and platelets. *Hematologie.* 109–115. doi:10.1684/hma.2012.0697.
- Leong, D.P., M. McKee, S. Rangarajan, P. Pais, L. Liu, S.S. Anand, and S. Yusuf. 2017. Patterns of Alcohol Consumption and Myocardial Infarction Risk. 22.
- Li, X., J. Mai, A. Virtue, Y. Yin, R. Gong, X. Sha, S. Gutchigian, A. Frisch, I. Hodge, X. Jiang, H. Wang, and X.-F. Yang. 2012. IL-35 Is a Novel Responsive Anti-inflammatory Cytokine — A New System of Categorizing Anti-inflammatory Cytokines. *PLoS ONE.* 7. doi:10.1371/journal.pone.0033628.
- Li, X., S. Samnick, C. Lapa, I. Israel, A.K. Buck, M.C. Kreissl, and W. Bauer. 2012. ⁶⁸Ga-DOTATATE PET/CT for the detection of inflammation of large arteries: correlation with ¹⁸F-FDG, calcium burden and risk factors. *EJNMMI Res.* 2:52. doi:10.1186/2191-219X-2-52.
- Li, X., Y. Shao, X. Sha, P. Fang, Y.-M. Kuo, A.J. Andrews, Y. Li, W.Y. Yang, M. Maddaloni, D.W. Pascual, J.J. Luo, X. Jiang, H. Wang, and X. Yang. 2018. IL-35 (Interleukin-35) Suppresses Endothelial Cell Activation by

- Inhibiting Mitochondrial Reactive Oxygen Species-Mediated Site-Specific Acetylation of H3K14 (Histone 3 Lysine 14). 26.
- Libby, P. 2017. Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70:2278–2289. doi:10.1016/j.jacc.2017.09.028.
- Libby, P., and G. Pasterkamp. 2015. Requiem for the ‘vulnerable plaque.’ *Eur. Heart J.* ehv349. doi:10.1093/eurheartj/ehv349.
- Lincoff, A.M., S.J. Nicholls, J.S. Riesmeyer, P.J. Barter, H.B. Brewer, K.A.A. Fox, C.M. Gibson, C. Granger, V. Menon, G. Montalescot, D. Rader, A.R. Tall, E. McErlean, K. Wolski, G. Ruotolo, B. Vangerow, G. Weerakkody, S.G. Goodman, D. Conde, D.K. McGuire, J.C. Nicolau, J.L. Leiva-Pons, Y. Pesant, W. Li, D. Kandath, S. Kouz, N. Tahirkheli, D. Mason, and S.E. Nissen. 2017. Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 376:1933–1942. doi:10.1056/NEJMoa1609581.
- Linton, M.F., P.G. Yancey, S.S. Davies, W.G. (Jay) Jerome, E.F. Linton, and K.C. Vickers. 2000. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In *Endotext*. L.J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K.R. Feingold, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, and A. Vinik, editors. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- Little, W.C., M. Constantinescu, R.J. Applegate, M.A. Kutcher, M.T. Burrows, F.R. Kahl, and W.P. Santamore. 1988. Can coronary angiography predict the site of a subsequent myocardial infarction in patients with mild-to-moderate coronary artery disease? *Circulation.* 78:1157–1166. doi:10.1161/01.CIR.78.5.1157.
- Liu, Y., B.P. Davidson, Q. Yue, T. Belcik, A. Xie, Y. Inaba, O.J.T. McCarty, G.W. Tormoen, Y. Zhao, Z.M. Ruggeri, B.A. Kaufmann, and J.R. Lindner. 2013. Molecular Imaging of Inflammation and Platelet Adhesion in Advanced Atherosclerosis Effects of Antioxidant Therapy With NADPH Oxidase Inhibition. *Circ. Cardiovasc. Imaging.* 6:74–82. doi:10.1161/CIRCIMAGING.112.975193.
- Lloyd, A., L. Steele, J. Fotheringham, J. Iqbal, A. Sultan, M.D. Teare, and E.D. Grech. 2017. Pronounced increase in risk of acute ST-segment elevation myocardial infarction in younger smokers. *Heart.* 103:586–591. doi:10.1136/heartjnl-2016-309595.
- Lorenz, M.W., H.S. Markus, M.L. Bots, M. Rosvall, and M. Sitzer. 2007. Prediction of Clinical Cardiovascular Events With Carotid Intima-Media Thickness: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation.* 115:459–467. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.628875.
- Lorenz, M.W., C. Schaefer, H. Steinmetz and M. Sitzer. 2010. Is carotid intima media thickness useful for individual prediction of cardiovascular risk? Ten-year results from the carotid atherosclerosis progression study (CAPS). *Eur. Heart J.* 31:2041–2048. doi:10.1093/eurheartj/ehq189.
- Lu, M.T., M. Ferencik, R.S. Roberts, K.L. Lee, A. Ivanov, E. Adami, D.B. Mark, F.A. Jaffer, J.A. Leipsic, P.S. Douglas, and U. Hoffmann. 2017. Noninvasive FFR Derived From Coronary CT Angiography. *JACC Cardiovasc. Imaging.* 10:1350–1358. doi:10.1016/j.jcmg.2016.11.024.
- Lutgens, E., D. Lievens, L. Beckers, M. Donners, and M. Daemen. 2007. CD40 and Its Ligand in Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 17:118–123. doi:10.1016/j.tcm.2007.02.004.
- MacLeod, D.C., B.H. Strauss, M. de Jong, J. Escaned, V.A. Umans, R.J. van Suylen, A. Verkerk, P.J. de Feyter, and P.W. Serruys. 1994. Proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth muscle cells cultured from human coronary atherosclerotic and restenotic lesions. *J. Am. Coll. Cardiol.* 23:59–65.
- Mahaffey, K.W., D.M. Wojdyla, K. Carroll, R.C. Becker, R.F. Storey, D.J. Angiolillo, C. Held, C.P. Cannon, S. James, K.S. Pieper, J. Horrow, R.A. Harrington, L. Wallentin, and on behalf of the PLATO Investigators. 2011. Ticagrelor Compared With Clopidogrel by Geographic Region in the Platelet Inhibition and Patient Outcomes (PLATO) Trial. *Circulation.* 124:544–554. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.047498.

- Mallat, Z., S. Besnard, M. Duriez, V. Deleuze, F. Emmanuel, M.F. Bureau, F. Soubrier, B. Esposito, H. Duez, C. Fievet, B. Staels, N. Duverger, D. Scherman, and A. Tedgui. 1999. Protective Role of Interleukin-10 in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 85:e17–e24. doi:10.1161/01.RES.85.8.e17.
- Mallat, Z., A. Corbaz, A. Scoazec, S. Besnard, G. Leseche, Y. Chvatchko, and A. Tedgui. 2001. Expression of Interleukin-18 in Human Atherosclerotic Plaques and Relation to Plaque Instability. *Circulation.* 104:1598–1603. doi:10.1161/hc3901.096721.
- Mangoni, A.A., A. Zinellu, S. Sotgia, C. Carru, and G.L. Erre. 2017. Methotrexate and Cardiovascular Protection: Current Evidence and Future Directions. *Clin. Med. Insights Ther.* 9:1179559X1774128. doi:10.1177/1179559X17741289.
- Mann, J., and M.J. Davies. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. 4.
- Mao, Y., Y. Peng, Q. Zeng, L. Cheng, B. Wang, X. Mao, K. Meng, Y. Liu, Y. Lian, and D. Li. 2015. A Potential Mechanism of High-Dose Ticagrelor in Modulating Platelet Activity and Atherosclerosis Mediated by Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor. *PLOS ONE.* 10:e0141464. doi:10.1371/journal.pone.0141464.
- Martin, C., P.C. Burdon, G. Bridger, J.-C. Gutierrez-Ramos, T.J. Williams, and S.M. Rankin. 2003. Chemokines Acting via CXCR2 and CXCR4 Control the Release of Neutrophils from the Bone Marrow and Their Return following Senescence. *Immunity.* 19:583–593. doi:10.1016/S1074-7613(03)00263-2.
- Martínez, G.J., D.S. Celermajer, and S. Patel. 2018. The NLRP3 inflammasome and the emerging role of colchicine to inhibit atherosclerosis-associated inflammation. *Atherosclerosis.* 269:262–271. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.12.027.
- Massberg, S, K. Brand, S. Grüner, S. Page, E. Müller, I. Müller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt and M. Gawaz. 2002. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J. Exp. Med.* 196:887-896.
- Mateo, J., D. Izquierdo-Garcia, J.B. Juan, Z.A. Fayad and V. Fuster. 2014. Noninvasive assessment of hypoxia in rabbit advanced atherosclerosis using 18F-fluoromisonidazole PET imaging. *Circ. Cardiovasc. Imaging.* 7:312-320. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.113.001084.
- Matter, C.M. 2005. 18F-Choline Images Murine Atherosclerotic Plaques Ex Vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26:584–589. doi:10.1161/01.ATV.0000200106.34016.18.
- McGill, H.C., C.A. McMahan, E.E. Herderick, R.E. Tracy, G.T. Malcom, A.W. Zieske, and J.P. Strong. 2000. Effects of Coronary Heart Disease Risk Factors on Atherosclerosis of Selected Regions of the Aorta and Right Coronary Artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:836–845. doi:10.1161/01.ATV.20.3.836.
- McKellar, G.E., D.W. McCarey, N. Sattar, and I.B. McInnes. 2009. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 6:410–417. doi:10.1038/nrcardio.2009.57.
- Mega, J.L., E. Braunwald, S.D. Wiviott, J.-P. Bassand, D.L. Bhatt, C. Bode, P. Burton, M. Cohen, N. Cook-Bruno, K.A.A. Fox, S. Goto, S.A. Murphy, A.N. Plotnikov, D. Schneider, X. Sun, F.W.A. Verheugt, and C.M. Gibson. 2012. Rivaroxaban in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 366:9–19. doi:10.1056/NEJMoa1112277.
- Meijboom, W.B., M.F.L. Meijs, J.D. Schuijf, M.J. Cramer, N.R. Mollet, C.A.G. van Mieghem, K. Nieman, J.M. van Werkhoven, G. Pundziute, A.C. Weustink, A.M. de Vos, F. Pugliese, B. Rensing, J.W. Jukema, J.J. Bax, M. Prokop, P.A. Doevendans, M.G.M. Hunink, G.P. Krestin, and P.J. de Feyter. 2008. Diagnostic Accuracy of 64-Slice Computed Tomography Coronary Angiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52:2135–2144. doi:10.1016/j.jacc.2008.08.058.

- Mendelsohn, M.E., and R.H. Karas. 1999. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* 340:1801–1811. doi:10.1056/NEJM199906103402306.
- Meng, X., J. Yang, M. Dong, K. Zhang, E. Tu, Q. Gao, W. Chen, C. Zhang, and Y. Zhang. 2016. Regulatory T cells in cardiovascular diseases. *Nat. Rev. Cardiol.* 13:167–179. doi:10.1038/nrcardio.2015.169.
- Merlini, P.A., K.A. Bauer, L. Oltrona, D. Ardissino, M. Cattaneo, C. Belli, P.M. Mannucci, and R.D. Rosenberg. 1994. Persistent activation of coagulation mechanism in unstable angina and myocardial infarction. *Circulation.* 90:61–68. doi:10.1161/01.CIR.90.1.61.
- Michelsen, K.S., M.H. Wong, P.K. Shah, W. Zhang, J. Yano, T.M. Doherty, S. Akira, T.B. Rajavashisth, and M. Arditi. 2004. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:10679–10684. doi:10.1073/pnas.0403249101.
- Miller, A.M., D. Xu, D.L. Asquith, L. Denby, Y. Li, N. Sattar, A.H. Baker, I.B. McInnes, and F.Y. Liew. 2008. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J. Exp. Med.* 205:339–346. doi:10.1084/jem.20071868.
- Miller, JM. C.E Rochitte, M.Dewey, A.Arab-Zadeh, H.Niinuma, I.Gottlieb, N. Paul, M.E.Clouse, E.P.shapiro, J.Hoe, A.C.Lardo, D.E.Bush, A.de Roos, C.Cox, J.Brinker, J.A.Lima. Diagnostic Performance of Coronary Angiography by 64-Row CT. 2008. *N Engl J Med.* 13.
- Mitsumori, L.M., T.S. Hatsukami, M.S. Ferguson, W.S. Kerwin, J. Cai and C. Yuan. 2003. In vivo accuracy of multisequence MR imaging for identifying unstable fibrous caps in advanced human carotid plaques. *J. Magn. Reson. imaging.* 17:410-420. doi:10.1002/jmri.10264.
- Moghbeli, N., A.J. Kirtane, K.K. Ray, S.A. Murphy, C.M. Gibson, E. Braunwald, and C.P. Cannon. 2005. C-Reactive Protein and Cardiovascular Outcomes in Smokers Versus Nonsmokers in Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndrome (from the TACTICS-TIMI 18 Trial). *Am. J. Cardiol.* 96:635–638. doi:10.1016/j.amjcard.2005.04.033.
- Moore, K.J., F.J. Sheedy, and E.A. Fisher. 2013. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat. Rev. Immunol.* 13:709–721. doi:10.1038/nri3520.
- Moore, K.J., and I. Tabas. 2011. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 145:341–355. doi:10.1016/j.cell.2011.04.005.
- Mor, A., D. Planer, G. Luboshits, A. Afek, S. Metzger, T. Chajek-Shaul, G. Keren, and J. George. 2007. Role of Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Experimental Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27:893–900. doi:10.1161/01.ATV.0000259365.31469.89.
- Moreno, P.R. 2006. Neovascularization in Human Atherosclerosis. *Circulation.* 113:2245–2252. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.578955.
- Morris, P.B., B.A. Ference, E. Jahangir, D.N. Feldman, J.J. Ryan, H. Bahrami, M.F. El-Chami, S. Bhakta, D.E. Winchester, M.H. Al-Mallah, M. Sanchez Shields, P. Deedwania, L.S. Mehta, B.A.P. Phan, and N.L. Benowitz. 2015. Cardiovascular Effects of Exposure to Cigarette Smoke and Electronic Cigarettes: Clinical Perspectives From the Prevention of Cardiovascular Disease Section Leadership Council and Early Career Councils of the American College of Cardiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66:1378–1391. doi:10.1016/j.jacc.2015.07.037.
- Motovska, Z., O. Hlinomaz, R. Miklik, M. Hromadka, I. Varvarovsky, J. Dusek, J. Knot, J. Jarkovsky, P. Kala, R. Rokyta, F. Tousek, P. Kramarikova, B. Majtan, S. Simek, M. Branny, J. Mrozek, P. Cervinka, J. Ostransky, and P. Widimsky. 2016. Prasugrel Versus Ticagrelor in Patients With Acute Myocardial Infarction Treated With Primary Percutaneous Coronary InterventionClinical Perspective: Multicenter Randomized PRAGUE-18 Study. *Circulation.* 134:1603–1612. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024823.

- Motoyama, S., M. Sarai, H. Harigaya, H. Anno, K. Inoue, T. Hara, H. Naruse, J. Ishii, H. Hishida, N.D. Wong, R. Virmani, T. Kondo, Y. Ozaki, and J. Narula. 2009. Computed Tomographic Angiography Characteristics of Atherosclerotic Plaques Subsequently Resulting in Acute Coronary Syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54:49–57. doi:10.1016/j.jacc.2009.02.068.
- Muller, J.E, G.H. Tofler and P.H. Stone. 1989. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation.* 79:733-744.
- Mullick, A.E., K. Soldau, W.B. Kiosses, T.A. Bell, P.S. Tobias, and L.K. Curtiss. 2008. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J. Exp. Med.* 205:373–383. doi:10.1084/jem.20071096.
- Muñoz-Pacheco, P., A. Ortega-Hernández, M. Miana, V. Cachofeiro, A. Fernández-Cruz, and D. Gómez-Garre. 2012. Ezetimibe inhibits PMA-induced monocyte/macrophage differentiation by altering microRNA expression: A novel anti-atherosclerotic mechanism. *Pharmacol. Res.* 66:536–543. doi:10.1016/j.phrs.2012.09.005.
- Murphy, A.J., M. Akhtari, S. Tolani, T. Pagler, N. Bijl, C.-L. Kuo, M. Wang, M. Sanson, S. Abramowicz, C. Welch, A.E. Bochem, J.A. Kuivenhoven, L. Yvan-Charvet, and A.R. Tall. 2011. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J. Clin. Invest.* 121:4138–4149. doi:10.1172/JCI57559.
- Murray, P.J., J.E. Allen, S.K. Biswas, E.A. Fisher, D.W. Gilroy, S. Goerdt, S. Gordon, J.A. Hamilton, L.B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F.O. Martinez, J.-L. Mege, D.M. Mosser, G. Natoli, J.P. Saeij, J.L. Schultze, K.A. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, J.A. van Ginderachter, S.N. Vogel, and T.A. Wynn. 2014. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity.* 41:14–20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008.
- Muyldermans, S., T. Atarhouch, J. Saldanha, J.A. Barbosa and R. Hamers. 1994. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein. Eng.* 7:1129-1135.
- Muyldermans, S. 2013. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* 82:775–797. doi:10.1146/annurev-biochem-063011-092449.
- Myocardial Infarction Genetics Consortium Investigators, et al. 2014. Inactivating mutations in NPC1L1 and protection from coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 371:2072–2082. doi:10.1056/NEJMoa1405386.
- Nabi, H., M. Kivimäki, G.D. Batty, M.J. Shipley, A. Britton, E.J. Brunner, J. Vahtera, C. Lemogne, A. Elbaz, and A. Singh-Manoux. 2013. Increased risk of coronary heart disease among individuals reporting adverse impact of stress on their health: the Whitehall II prospective cohort study. *Eur. Heart J.* 34:2697–2705. doi:10.1093/eurheartj/eh216.
- Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69:562–573. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002.
- Naghavi, M., P. Libby, E. Falk and al. 2003. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part 1. *Circ.* 108:1664-1672. doi:10.1161/01.CIR.0000087480.94275.97.
- Naghavi, M., A.A. Abajobir, C. Abbafati, et al. 2017. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet.* 390:1151–1210. doi:10.1016/S0140-6736(17)32152-9.
- Naghavi, M., and E. Falk. 2011. From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient. In *Asymptomatic Atherosclerosis*. M. Naghavi, editor. Humana Press, Totowa, NJ. 13–38.

- Nahrendorf, M., F.A. Jaffer, K.A. Kelly, D.E. Sosnovik, E. Aikawa, P. Libby, and R. Weissleder. 2006. Noninvasive Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Imaging Identifies Inflammatory Activation of Cells in Atherosclerosis. *Circulation*. 114:1504–1511. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646380.
- Nahrendorf, M., E. Keliher, P. Panizzi, H. Zhang, S. Hembrador, J.-L. Figueiredo, E. Aikawa, K. Kelly, P. Libby, and R. Weissleder. 2009. 18F-4V for PET–CT Imaging of VCAM-1 Expression in Atherosclerosis. *JACC Cardiovasc. Imaging*. 2:1213–1222. doi:10.1016/j.jcmg.2009.04.016.
- Nakashima, Y., A.S. Plump, E.W. Raines, J.L. Breslow, and R. Ross. 1994. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.* 14:133–140.
- Narula, J., M. Nakano, R. Virmani, F.D. Kolodgie, R. Petersen, R. Newcomb, S. Malik, V. Fuster, and A.V. Finn. 2013. Histopathologic Characteristics of Atherosclerotic Coronary Disease and Implications of the Findings for the Invasive and Noninvasive Detection of Vulnerable Plaques. *J. Am. Coll. Cardiol.* 61:1041–1051. doi:10.1016/j.jacc.2012.10.054.
- Nasir, K., M.J. Budoff, W.S. Post, E.K. Fishman, M. Mahesh, J.A. Lima, and R.S. Blumenthal. 2003. Electron beam CT versus helical CT scans for assessing coronary calcification: current utility and future directions. *Am. Heart J.* 146:969–977. doi:10.1016/S0002-8703(03)00450-2.
- New, S.E.P., C. Goettsch, M. Aikawa, J.F. Marchini, M. Shibasaki, K. Yabusaki, P. Libby, C.M. Shanahan, K. Croce, and E. Aikawa. 2013. Macrophage-Derived Matrix Vesicles: An Alternative Novel Mechanism for Microcalcification in Atherosclerotic Plaques. *Circ. Res.* 113:72–77. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301036.
- Newby, A.C. 2016. Metalloproteinase production from macrophages - a perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction: Metalloproteinases from macrophages. *Exp. Physiol.* 101:1327–1337. doi:10.1113/EP085567.
- Newby, D.E., P.M. Mannucci, G.S. Tell, A.A. Baccarelli, R.D. Brook, K. Donaldson, F. Forastiere, M. Franchini, O.H. Franco, I. Graham, G. Hoek, B. Hoffmann, M.F. Hoylaerts, N. Künzli, N. Mills, J. Pekkanen, A. Peters, M.F. Piepoli, S. Rajagopalan, and R.F. Storey. 2015. Expert position paper on air pollution and cardiovascular disease. *Eur. Heart J.* 36:83–93. doi:10.1093/eurheartj/ehu458.
- Niccoli, G., G. Scalone, and F. Crea. 2015. Acute myocardial infarction with no obstructive coronary atherosclerosis: mechanisms and management. *Eur. Heart J.* 36:475–481. doi:10.1093/eurheartj/ehu469.
- Nicholls, S.J., R. Puri, T. Anderson, C.M. Ballantyne, L. Cho, J.J.P. Kastelein, W. Koenig, R. Somaratne, H. Kassahun, J. Yang, S.M. Wasserman, R. Scott, I. Ungi, J. Podolec, A.O. Ophuis, J.H. Cornel, M. Borgman, D.M. Brennan, and S.E. Nissen. 2016. Effect of Evolocumab on Progression of Coronary Disease in Statin-Treated Patients: The GLAGOV Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 316:2373. doi:10.1001/jama.2016.16951.
- Nidorf, S.M., J.W. Eikelboom, C.A. Budgeon, P.L. Thompson. 2013. Low-dose colchicine for the secondary prevention of cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 61:404-410. doi:10.1016/j.jacc.2012.10.027.
- Nielsen, L.B. 1996. Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 123:1–15.
- Nissen, S.E., T. Tsunoda, E.M. Tuzcu, P. Schoenhagen, C.J. Cooper, M. Yasin, G.M. Eaton, M.A. Lauer, W.S. Sheldon, C.L. Grines, S. Halpern, T. Crowe, J.C. Blankenship, and R. Kerensky. 2003. Effect of Recombinant ApoA-I Milano on Coronary Atherosclerosis in Patients With Acute Coronary Syndromes: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 290:2292. doi:10.1001/jama.290.17.2292.

- Niu, X., S. Pi, S. Baral, Y. Xia, Q. He, Y. Li, H. Jin, M. Li, M. Wang, L. Mao, and B. Hu. 2017. P2Y₁₂ Promotes Migration of Vascular Smooth Muscle Cells Through Cofilin Dephosphorylation During Atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37:515–524. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308725.
- North, B.J., and D.A. Sinclair. 2012. The Intersection Between Aging and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* 110:1097–1108. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.246876.
- Nylander, S., and R. Schulz. 2016. Effects of P2Y₁₂ receptor antagonists beyond platelet inhibition - comparison of ticagrelor with thienopyridines: P2Y₁₂ receptors beyond platelet inhibition. *Br. J. Pharmacol.* 173:1163–1178. doi:10.1111/bph.13429.
- O'Brien, K.D., M.D. Allen, T.O. McDonald, A. Chait, J.M. Harlan, D. Fishbein, J. McCarty, M. Ferguson, K. Hudkins, and C.D. Benjamin. 1993. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 92:945–951. doi:10.1172/JCI116670.
- Ogami, M., Y. Ikura, M. Ohsawa, T. Matsuo, S. Kayo, N. Yoshimi, E. Hai, N. Shirai, S. Ehara, R. Komatsu, T. Naruko, and M. Ueda. 2004. Telomere Shortening in Human Coronary Artery Diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:546–550. doi:10.1161/01.ATV.0000117200.46938.e7.
- Ohno, K., A. Tomizawa, J.A. Jakubowski, M. Mizuno, and A. Sugidachi. 2015. Prevention of occlusive arterial thrombus formation by a single loading dose of prasugrel suppresses neointimal hyperplasia in mice. *Thromb. Res.* 136:1245–1251. doi:10.1016/j.thromres.2015.10.010.
- Ohta, H., H. Wada, T. Niwa, H. Kirii, N. Iwamoto, H. Fujii, K. Saito, K. Sekikawa, and M. Seishima. 2005. Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 180:11–17. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.016.
- Omidfar, K. M.J. Rasaei, S. Kashanian, M. Paknejad, Z. Bathaie. 2007. Studies of thermostability in camelus (Bactrian camel) single domain antibody specific for the mutant epidermal growth factor receptor expressed by Pichia. *Biotechnol appl biochem.* 41-9. doi:10.1042/BA20060104
- Osborn, L., C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso, and R. Lobb. 1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell.* 59:1203–1211. doi:10.1016/0092-8674(89)90775-7.
- Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff. 2004. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.* 84:767–801. doi:10.1152/physrev.00041.2003.
- Panayiotou, A.G., A.N. Nicolaides, M. Griffin, T. Tyllis, N. Georgiou, D. Bond, R.M. Martin, D. Hoppensteadt, J. Fareed, and S.E. Humphries. 2010. Leukocyte telomere length is associated with measures of subclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 211:176–181. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.037.
- Paneni, F., C. Diaz Cañestro, P. Libby, T.F. Lüscher, and G.G. Camici. 2017. The Aging Cardiovascular System. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69:1952–1967. doi:10.1016/j.jacc.2017.01.064.
- Pardon, E., T. Laeremans, S. Triest, S.G.F. Rasmussen, A. Wohlkönig, A. Ruf, S. Muyldermans, W.G.J. Hol, B.K. Kobilka, and J. Steyaert. 2014. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat. Protoc.* 9:674–693. doi:10.1038/nprot.2014.039.
- Park, H.-B., R. Heo, B. ó Hartaigh, I. Cho, H. Gransar, R. Nakazato, J. Leipsic, G.B.J. Mancini, B.-K. Koo, H. Otake, M.J. Budoff, D.S. Berman, A. Erglis, H.-J. Chang, and J.K. Min. 2015. Atherosclerotic Plaque Characteristics by CT Angiography Identify Coronary Lesions That Cause Ischemia. *JACC Cardiovasc. Imaging.* 8:1–10. doi:10.1016/j.jcmg.2014.11.002.

- Parthasarathy, S., A. Raghavamenon, M.O. Garelnabi, and N. Santanam. 2010. Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Methods Mol. Biol. Clifton Nj.* 610:403–417. doi:10.1007/978-1-60327-029-8_24.
- Partida, R.A., P. Libby, F. Crea, and I.-K. Jang. 2018. Plaque erosion: a new in vivo diagnosis and a potential major shift in the management of patients with acute coronary syndromes. *Eur. Heart J.* doi:10.1093/eurheartj/ehx786.
- Pasterkamp, G., H.M. den Ruijter, and P. Libby. 2017. Temporal shifts in clinical presentation and underlying mechanisms of atherosclerotic disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 14:21–29. doi:10.1038/nrcardio.2016.166.
- Paulson, K.E., S.-N. Zhu, M. Chen, S. Nurmohamed, J. Jongstra-Bilen, and M.I. Cybulsky. 2010. Resident Intimal Dendritic Cells Accumulate Lipid and Contribute to the Initiation of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 106:383–390. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.210781.
- Pedersen, S.F., B.V. Sandholt, S.H. Keller, A.E. Hansen, A.E. Clemmensen, H. Sillesen, L. Højgaard, R.S. Ripa, and A. Kjær. 2015. ⁶⁴ Cu-DOTATATE PET/MRI for Detection of Activated Macrophages in Carotid Atherosclerotic Plaques Significance: Studies in Patients Undergoing Endarterectomy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35:1696–1703. doi:10.1161/ATVBAHA.114.305067.
- Perk, J., G. De Backer, H. Gohlke and al. 2012. European guidelines on cardiovascular prevention in clinical practice. *Eur. Heart J.* 33:1635-1701. doi:10.1093/eurheartj/ehs092.
- Peters, S.A.E., H.M. den Ruijter, D.E. Grobbee, and M.L. Bots. 2013. Results From a Carotid Intima-Media Thickness Trial as a Decision Tool for Launching a Large-Scale Morbidity and Mortality Trial. *Circ. Cardiovasc. Imaging.* 6:20–25. doi:10.1161/CIRCIMAGING.112.978114.
- Philipp-Abbrederis, K., K. Hemmann, S. Knop and al. 2015. In vivo molecular imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in patients with advanced multiple myeloma. *EMBO. Mol. Med.* 7:477-487. doi:10.15252/emmm.201404698.
- Physical Activity and Public Health: Updated Recommendation for Adults From the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. 2007. *Circulation.* 116:1081–1093. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.185649.
- Piepoli, M.F., A.W. Hoes, S. Agewall, C. Albus, C. Brotons, A.L. Catapano, M.-T. Cooney, U. Corrà, B. Cosyns, C. Deaton, I. Graham, M.S. Hall, F.D.R. Hobbs, M.-L. Løchen, H. Löllgen, P. Marques-Vidal, J. Perk, E. Prescott, J. Redon, D.J. Richter, N. Sattar, Y. Smulders, M. Tiberi, H.B. van der Worp, I. van Dis, and W.M.M. Verschuren. 2016. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur. Heart J.* 37:2315–2381. doi:10.1093/eurheartj/ehw106.
- Pijls, N.H.J. 2018. Experimental Basis of Determining Maximum Coronary, Myocardial, and Collateral Blood Flow by Pressure Measurements for Assessing Functional Stenosis Severity Before and After Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty. 15.
- Pijls, N.H.J., P. van Schaardenburgh, G. Manoharan, E. Boersma, J.-W. Bech, M. van't Veer, F. Bär, J. Hoorntje, J. Koolen, W. Wijns, and B. de Bruyne. 2007. Percutaneous Coronary Intervention of Functionally Nonsignificant Stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 49:2105–2111. doi:10.1016/j.jacc.2007.01.087.
- Polonsky, T.S. 2010. Coronary Artery Calcium Score and Risk Classification for Coronary Heart Disease Prediction. *JAMA.* 303:1610. doi:10.1001/jama.2010.461.
- Pothineni, N.V.K., S. Subramany, K. Kuriakose, L.F. Shirazi, F. Romeo, P.K. Shah, and J.L. Mehta. 2017. Infections, atherosclerosis, and coronary heart disease. *Eur. Heart J.* 38:3195–3201. doi:10.1093/eurheartj/ehx362.
- Pradhan, A.D. 2001. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA.* 286:327. doi:10.1001/jama.286.3.327.

- Pradhan, A.D., A.W. Aday, L.M. Rose, and P.M. Ridker. 2018. Residual Inflammatory Risk On Treatment with PCSK9 Inhibition and Statin Therapy. *Circulation*. CIRCULATIONAHA.118.034645. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034645.
- Praticò, D., C. Tillmann, Z.-B. Zhang, H. Li, and G.A. FitzGerald. 2001. Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:3358–3363. doi:10.1073/pnas.061607398.
- Preusch, M.R., J. Rusnak, K. Staudacher, C. Mogler, L. Uhlmann, P. Sievers, F. Bea, H.A. Katus, E. Blessing, and I. Staudacher. 2016. Ticagrelor promotes atherosclerotic plaque stability in a mouse model of advanced atherosclerosis. *Drug Des. Devel. Ther.* Volume 10:2691–2699. doi:10.2147/DDDT.S105718.
- Psaty, B.M., N.L. Smith, D.S. Siscovick, T.D. Koepsell, N.S. Weiss, S.R. Heckbert, R.N. Lemaitre, E.H. Wagner, and C.D. Furberg. 1998. Health Outcomes Associated with Antihypertensive Therapies Used as First-Line Agents: A Systematic Review and Meta-analysis. *Surv. Anesthesiol.* 42:173. doi:10.1097/00132586-199806000-00059.
- Puchner, S.B., T. Liu, T. Mayrhofer, Q.A. Truong, H. Lee, J.L. Fleg, J.T. Nagurney, J.E. Udelson, U. Hoffmann, and M. Ferencik. 2014. High-Risk Plaque Detected on Coronary CT Angiography Predicts Acute Coronary Syndromes Independent of Significant Stenosis in Acute Chest Pain. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64:684–692. doi:10.1016/j.jacc.2014.05.039.
- Puymirat, E., T. Simon, G. Cayla, Y. Cottin, M. Elbaz, P. Coste, G. Lemesle, P. Motreff, B. Popovic, K. Khalife, J.-N. Labèque, T. Perret, C. Le Ray, L. Orion, B. Jouve, D. Blanchard, P. Peycher, J. Silvain, P.G. Steg, P. Goldstein, P. Guéret, L. Belle, N. Aissaoui, J. Ferrières, F. Schiele, and N. Danchin. 2017. Acute Myocardial Infarction: Changes in Patient Characteristics, Management, and 6-Month Outcomes Over a Period of 20 Years in the FAST-MI Program (French Registry of Acute ST-Elevation or Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) 1995 to 2015. *Circulation*. 136:1908–1919. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030798.
- Qin, P., L.A. Borges-Marcucci, M.J. Evans, and D.C. Harnish. 2005. Bile acid signaling through FXR induces intracellular adhesion molecule-1 expression in mouse liver and human hepatocytes. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 289:G267–G273. doi:10.1152/ajpgi.00043.2005.
- Quillard, T., H.A. Araújo, G. Franck, E. Shvartz, G. Sukhova, and P. Libby. 2015. TLR2 and neutrophils potentiate endothelial stress, apoptosis and detachment: implications for superficial erosion. *Eur. Heart J.* 36:1394–1404. doi:10.1093/eurheartj/ehv044.
- Radecke, C., A. Warrick, G. Singh, J. Rogers, S. Simon, and E. Armstrong. 2015. Coronary artery endothelial cells and microparticles increase expression of VCAM-1 in myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* 113:605–616. doi:10.1160/TH14-02-0151.
- Rajavashisth, T., J.H. Qiao, S. Tripathi, J. Tripathi, N. Mishra, M. Hua, X.P. Wang, A. Loussarian, S. Clinton, P. Libby, and A. Lusis. 1998. Heterozygous osteopetrotic (op) mutation reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 101:2702–2710.
- Rajavashisth, T.B., A. Andalibi, M.C. Territo, J.A. Berliner, M. Navab, A.M. Fogelman, and A.J. Lusis. 1990. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*. 344:254–257. doi:10.1038/344254a0.
- Ray, K.K., U. Landmesser, L.A. Leiter, D. Kallend, R. Dufour, M. Karakas, T. Hall, R.P.T. Troquay, T. Turner, F.L.J. Visseren, P. Wijngaard, R.S. Wright, and J.J.P. Kastelein. 2017. Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 376:1430–1440. doi:10.1056/NEJMoa1615758.
- Reiner, M.F., A. Akhmedov, S. Stivala, S. Keller, D.S. Gaul, N.R. Bonetti, G. Savarese, M. Glanzmann, C. Zhu, W. Ruf, Z. Yang, C.M. Matter, T.F. Lüscher, G.G. Camici, and J.H. Beer. 2017. Ticagrelor, but not

- clopidogrel, reduces arterial thrombosis via endothelial tissue factor suppression. *Cardiovasc. Res.* 113:61–69. doi:10.1093/cvr/cvw233.
- Reiss, A.B. Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective? 11.
- Ricci, R., G. Sumara, I. Sumara, I. Rozenberg, M. Kurrer, A. Akhmedov, M. Hersberger, U. Eriksson, F.R. Eberli, B. Becher, J. Boren, M. Chen, M.I. Cybulsky, K.J. Moore, M.W. Freeman, E.F. Wagner, C.M. Matter, and T.F. Luscher. 2018. Requirement of JNK2 for Scavenger Receptor A–Mediated Foam Cell Formation in Atherogenesis. 306:5.
- Rice, G., and M. Bevilacqua. 1989. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science.* 246:1303–1306. doi:10.1126/science.2588007.
- Richardson, P.D., M.J. Davies, and G.V. Born. 1989. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet Lond. Engl.* 2:941–944.
- Ridker, P.M. 2003. Clinical Application of C-Reactive Protein for Cardiovascular Disease Detection and Prevention. *Circulation.* 107:363–369. doi:10.1161/01.CIR.0000053730.47739.3C.
- Ridker, P.M. 2014. Targeting inflammatory pathways for the treatment of cardiovascular disease. *Eur. Heart J.* 35:540–543. doi:10.1093/eurheartj/eh398.
- Ridker, P.M., E. Danielson, F.A.H. Fonseca, J. Genest, A.M. Gotto, J.J.P. Kastelein, W. Koenig, P. Libby, A.J. Lorenzatti, J.G. MacFadyen, B.G. Nordestgaard, J. Shepherd, J.T. Willerson, and R.J. Glynn. 2008. Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. *N. Engl. J. Med.* 359:2195–2207. doi:10.1056/NEJMoa0807646.
- Ridker, P.M., B.M. Everett, T. Thuren, J.G. MacFadyen, W.H. Chang, C. Ballantyne, F. Fonseca, J. Nicolau, W. Koenig, S.D. Anker, J.J.P. Kastelein, J.H. Cornel, P. Pais, D. Pella, J. Genest, R. Cifkova, A. Lorenzatti, T. Forster, Z. Kobalava, L. Vida-Simiti, M. Flather, H. Shimokawa, H. Ogawa, M. Dellborg, P.R.F. Rossi, R.P.T. Troquay, P. Libby, and R.J. Glynn. 2017a. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* 377:1119–1131. doi:10.1056/NEJMoa1707914.
- Ridker, P.M., J.G. MacFadyen, B.M. Everett, and M. Ligueros. 2018. Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *The Lancet.* 391:319–328. doi:10.1016/S0140-6736(17)32814-3.
- Ridker, P.M., J. Revkin, P. Amarenco, R. Brunell, M. Curto, F. Civeira, M. Flather, R.J. Glynn, J. Gregoire, J.W. Jukema, Y. Karpov, J.J.P. Kastelein, W. Koenig, A. Lorenzatti, P. Manga, U. Masiukiewicz, M. Miller, A. Mosterd, J. Murin, J.C. Nicolau, S. Nissen, P. Ponikowski, R.D. Santos, P.F. Schwartz, H. Soran, H. White, R.S. Wright, M. Vrablik, C. Yunis, C.L. Shear, and J.-C. Tardif. 2017. Cardiovascular Efficacy and Safety of Boccizumab in High-Risk Patients. *N. Engl. J. Med.* 376:1527–1539. doi:10.1056/NEJMoa1701488.
- Robbins, C.S., A Chudnovskiy, P.J.Rauch et al. 2012. Extramedullar haematopoiesis generates Ly-6C^{high} Monocytes that infiltrate atherosclerosis lesions. *Circ.* 125:364-374. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.061986
- Robbins, C.S., I. Hilgendorf, G.F. Weber, I. Theurl, Y. Iwamoto, J.-L. Figueiredo, R. Gorbato, G.K. Sukhova, L.M.S. Gerhardt, D. Smyth, C.C.J. Zavitz, E.A. Shikatanj, M. Parsons, N. van Rooijen, H.Y. Lin, M. Husain, P. Libby, M. Nahrendorf, R. Weissleder, and F.K. Swirski. 2013. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat. Med.* 19:1166–1172. doi:10.1038/nm.3258.
- Rodriguez-Prados, J.-C., P.G. Traves, J. Cuenca, D. Rico, J. Aragones, P. Martin-Sanz, M. Cascante, and L. Bosca. 2010. Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. *J. Immunol.* 185:605–614. doi:10.4049/jimmunol.0901698.

- Roshan, M.H.K., A. Tambo, and N.P. Pace. 2016. The Role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int. J. Inflamm.* 2016:1–11. doi:10.1155/2016/1532832.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis- An inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340:115-126. doi:10.1056/NEJM199901143400207
- Rudd, J.H.F. 2002. Imaging Atherosclerotic Plaque Inflammation With [18F]-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography. *Circulation.* 105:2708–2711. doi:10.1161/01.CIR.0000020548.60110.76.
- Rudd, J.H.F., K.S. Myers, S. Bansilal, J. Machac, A. Rafique, M. Farkouh, V. Fuster, and Z.A. Fayad. 2007. 18Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Imaging of Atherosclerotic Plaque Inflammation Is Highly Reproducible. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50:892–896. doi:10.1016/j.jacc.2007.05.024.
- Sabatine, M.S., R.P. Giugliano, A.C. Keech, N. Honarpour, S.D. Wiviott, S.A. Murphy, J.F. Kuder, H. Wang, T. Liu, S.M. Wasserman, P.S. Sever, and T.R. Pedersen. 2017. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 376:1713–1722. doi:10.1056/NEJMoa1615664.
- Saitoh, T., H. Kishida, Y. Tsukada, Y. Fukuma, J. Sano, M. Yasutake, N. Fukuma, Y. Kusama, and H. Hayakawa. 2000. Clinical significance of increased plasma concentration of macrophage colony-stimulating factor in patients with angina pectoris. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35:655–665.
- Sattelmair, J., J. Pertman, E.L. Ding, H.W. Kohl, W. Haskell, and I.-M. Lee. 2011. Dose Response Between Physical Activity and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-Analysis. *Circulation.* 124:789–795. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.010710.
- Schrijvers, D.M., D. Meyer, G. R.y, A.G. Herman, and W. Martinet. 2007. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc. Res.* 73:470–480. doi:10.1016/j.cardiores.2006.09.005.
- Schwartz, G.G., A.G. Olsson, M. Abt, C.M. Ballantyne, P.J. Barter, J. Brumm, B.R. Chaitman, I.M. Holme, D. Kallend, L.A. Leiter, E. Leitersdorf, J.J.V. McMurray, H. Mundl, S.J. Nicholls, P.K. Shah, J.-C. Tardif, and R.S. Wright. 2012. Effects of Dalcetrapib in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 367:2089–2099. doi:10.1056/NEJMoa1206797.
- Schwartz, G.G., A.G. Olsson, M.D. Ezekowitz, P. Ganz, M.F. Oliver, D. Waters, A. Zeiher, B.R. Chaitman, S. Leslie, T. Stern, and Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. 2001. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 285:1711–1718.
- Schwartz, R.S., A. Burke, A. Farb, D. Kaye, J.R. Lesser, T.D. Henry, and R. Virmani. 2009. Microemboli and Microvascular Obstruction in Acute Coronary Thrombosis and Sudden Coronary Death. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54:2167–2173. doi:10.1016/j.jacc.2009.07.042.
- Schwartz, S.M., R. Virmani, and M.E. Rosenfeld. 2000. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2:422–429.
- Selathurai, A., V. Deswaerte, P. Kanellakis, P. Tipping, B.-H. Toh, A. Bobik, and T. Kyaw. 2014. Natural killer (NK) cells augment atherosclerosis by cytotoxic-dependent mechanisms. *Cardiovasc. Res.* 102:128–137. doi:10.1093/cvr/cvu016.
- Serhan, C.N. 2010. Novel Lipid Mediators and Resolution Mechanisms in Acute Inflammation. *Am. J. Pathol.* 177:1576–1591. doi:10.2353/ajpath.2010.100322.
- Shah, P.K., E. Falk, J.J. Badimon, A. Fernandez-Ortiz, A. Mailhac, G. Villareal-Levy, J.T. Fallon, J. Regnstrom, and V. Fuster. 1995. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation.* 92:1565–1569.

- Shah, P.K., J. Yano, O. Reyes, K.-Y. Chyu, S. Kaul, C.L. Bisgaier, S. Drake, and B. Cercek. 2001. High-Dose Recombinant Apolipoprotein A-IMilano Mobilizes Tissue Cholesterol and Rapidly Reduces Plaque Lipid and Macrophage Content in Apolipoprotein E-Deficient Mice : Potential Implications for Acute Plaque Stabilization. *Circulation*. 103:3047–3050. doi:10.1161/hc2501.092494.
- Shankman, L.S., D. Gomez, O.A. Cherepanova, M. Salmon, G.F. Alencar, R.M. Haskins, P. Swiatlowska, A.A.C. Newman, E.S. Greene, A.C. Straub, B. Isakson, G.J. Randolph, and G.K. Owens. 2015. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat. Med.* 21:628–637. doi:10.1038/nm.3866.
- Shaposhnik, Z., X. Wang, M. Weinstein, B.J. Bennett, and A.J. Lusis. 2007. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor regulates dendritic cell content of atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27:621–627. doi:10.1161/01.ATV.0000254673.55431.e6.
- Shen, P., T. Roch, V. Lampropoulou, R.A. O'Connor, U. Stervbo, E. Hilgenberg, S. Ries, V.D. Dang, Y. Jaimes, C. Daridon, R. Li, L. Jouneau, P. Boudinot, S. Wilantri, I. Sakwa, Y. Miyazaki, M.D. Leech, R.C. McPherson, S. Wirtz, M. Neurath, K. Hoehlig, E. Meinel, A. Grützkau, J.R. Grün, K. Horn, A.A. Kühl, T. Dörner, A. Bar-Or, S.H.E. Kaufmann, S.M. Anderton, and S. Fillatreau. 2014. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*. 507:366–370. doi:10.1038/nature12979.
- Shih, P.T., M.L. Brennan, D.K. Vora, M.C. Territo, D. Strahl, M.J. Elices, A.J. Lusis, and J.A. Berliner. 1999. Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ. Res.* 84:345–351.
- Sica, A., and A. Mantovani. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122:787–795. doi:10.1172/JCI59643.
- Sillescu, H., S. Sartori, B. Sandholt, U. Baber, R. Mehran, and V. Fuster. 2017. Carotid plaque thickness and carotid plaque burden predict future cardiovascular events in asymptomatic adult Americans. *Eur. Heart J. - Cardiovasc. Imaging*. doi:10.1093/ehjci/jex239.
- Simionescu, M., and N. Simionescu. 1993. Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 7:1359–1366.
- Sluimer, J.C., J.-M. Gasc, J.L. van Wanroij, N. Kisters, M. Groeneweg, M.D. Sollewijn Gelpke, J.P. Cleutjens, L.H. van den Akker, P. Corvol, B.G. Wouters, M.J. Daemen, and A.-P.J. Bijnens. 2008. Hypoxia, Hypoxia-Inducible Transcription Factor, and Macrophages in Human Atherosclerotic Plaques Are Correlated With Intraplaque Angiogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51:1258–1265. doi:10.1016/j.jacc.2007.12.025.
- Smith, J.D., E. Trogan, M. Ginsberg, C. Grigaux, J. Tian, and M. Miyata. 1995. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:8264–8268.
- Song, W.-L., and G.A. FitzGerald. 2013. Niacin, an old drug with a new twist. *J. Lipid Res.* 54:2586–2594. doi:10.1194/jlr.R040592.
- Stary, H.C., A.B. Chandler, R.E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, M.E. Rosenfeld, C.J. Schwartz, W.D. Wagner, and R.W. Wissler. 1995. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis : A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15:1512–1531. doi:10.1161/01.ATV.15.9.1512.
- Steeland, S., R.E. Vandenbroucke, and C. Libert. 2016. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov. Today*. 21:1076–1113. doi:10.1016/j.drudis.2016.04.003.

- Stewart, C.R., L.M. Stuart, K. Wilkinson, J.M. van Gils, J. Deng, A. Halle, K.J. Rayner, L. Boyer, R. Zhong, W.A. Frazier, A. Lacy-Hulbert, J.E. Khoury, D.T. Golenbock, and K.J. Moore. 2010. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* 11:155–161. doi:10.1038/ni.1836.
- Stone, G.W., A. Maehara, A.J. Lansky, B. de Bruyne, E. Cristea, G.S. Mintz, R. Mehran, J. McPherson, N. Farhat, S.P. Marso, H. Parise, B. Templin, R. White, Z. Zhang, and P.W. Serruys. 2011. A Prospective Natural-History Study of Coronary Atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 364:226–235. doi:10.1056/NEJMoa1002358.
- Stone, N.J., J.G. Robinson, A.H. Lichtenstein, C.N. Bairey Merz, C.B. Blum, R.H. Eckel, A.C. Goldberg, D. Gordon, D. Levy, D.M. Lloyd-Jones, P. McBride, J.S. Schwartz, S.T. Shero, S.C. Smith, K. Watson, P.W.F. Wilson, and American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2014. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63:2889–2934. doi:10.1016/j.jacc.2013.11.002.
- Strom, A., A. Cross, J. Cole, P. Blair, C. Leib, M. Goddard, E. Rosser, I. Park, A.H. Nilsson, J. Nilsson, C. Mauri, and C. Monaco. 2015. B regulatory cells are increased in hypercholesterolaemic mice and protect from lesion development via IL-10. *Thromb. Haemost.* 114:835–847. doi:10.1160/TH14-12-1084.
- Sudhop, T. 2002. Inhibition of Intestinal Cholesterol Absorption by Ezetimibe in Humans. *Circulation.* 106:1943–1948. doi:10.1161/01.CIR.0000034044.95911.DC.
- Sugiyama, S., Y. Okada, G.K. Sukhova, R. Virmani, J.W. Heinecke, and P. Libby. 2001. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am. J. Pathol.* 158:879–891. doi:10.1016/S0002-9440(10)64036-9.
- Sun, J., K. Hartvigsen, M.-Y. Chou, Y. Zhang, G.K. Sukhova, J. Zhang, M. Lopez-Illasaca, C.J. Diehl, N. Yakov, D. Harats, J. George, J.L. Witztum, P. Libby, H. Ploegh, and G.-P. Shi. 2010. Deficiency of Antigen-Presenting Cell Invariant Chain Reduces Atherosclerosis in Mice. *Circulation.* 122:808–820. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.891887.
- Swirski, F.K., I. Hilgendorf, and C.S. Robbins. 2014. From proliferation to proliferation: monocyte lineage comes full circle. *Semin. Immunopathol.* 36:137–148. doi:10.1007/s00281-013-0409-1.
- Swirski, F.K., P. Libby, E. Aikawa, P. Alcaide, F.W. Lusinskas, R. Weissleder, and M.J. Pittet. 2007. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocyteosis and give rise to macrophages in atheromata. *J. Clin. Invest.* 117:195–205. doi:10.1172/JCI29950.
- Swirski, F.K., C.S. Robbins, and M. Nahrendorf. 2016. Development and Function of Arterial and Cardiac Macrophages. *Trends Immunol.* 37:32–40. doi:10.1016/j.it.2015.11.004.
- Tan, H., J. Zhou, X. Yang, M. Abudupataer, X. Li, Y. Hu, J. Xiao, H. Shi, and D. Cheng. 2017. 99mTc-labeled bevacizumab for detecting atherosclerotic plaque linked to plaque neovascularization and monitoring antiangiogenic effects of atorvastatin treatment in ApoE^{-/-} mice. *Sci. Rep.* 7. doi:10.1038/s41598-017-03276-w.
- Taqueti, V.R., M.F. Di Carli, M. Jerosch-Herold, G.K. Sukhova, V.L. Murthy, E.J. Folco, R.Y. Kwong, C.K. Ozaki, M. Belkin, M. Nahrendorf, R. Weissleder, and P. Libby. 2014. Increased Microvascularization and Vessel Permeability Associate With Active Inflammation in Human Atheromata. *Circ. Cardiovasc. Imaging.* 7:920–929. doi:10.1161/CIRCIMAGING.114.002113.
- Tarkin, J.M., F.R. Joshi, N.R. Evans, M.M. Chowdhury, N.L. Figg, A.V. Shah, L.T. Starks, A. Martin-Garrido, R. Manavaki, E. Yu, R.E. Kuc, L. Grassi, R. Kreuzhuber, M.A. Kostadima, M. Frontini, P.J. Kirkpatrick, P.A.

- Coughlin, D. Gopalan, T.D. Fryer, J.R. Buscombe, A.M. Groves, W.H. Ouwehand, M.R. Bennett, E.A. Warburton, A.P. Davenport, and J.H.F. Rudd. 2017. Detection of Atherosclerotic Inflammation by 68 Ga-DOTATATE PET Compared to [18 F]FDG PET Imaging. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69:1774–1791. doi:10.1016/j.jacc.2017.01.060.
- Tawakol, A., Z.A. Fayad, R. Mogg, A. Alon, M.T. Klimas, H. Dansky, S.S. Subramanian, A. Abdelbaky, J.H.F. Rudd, M.E. Farkouh, I.O. Nunes, C.R. Beals, and S.S. Shankar. 2013. Intensification of Statin Therapy Results in a Rapid Reduction in Atherosclerotic Inflammation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62:909–917. doi:10.1016/j.jacc.2013.04.066.
- Tawakol, A., A. Ishai, R.A. Takx, A.L. Figueroa, A. Ali, Y. Kaiser, Q.A. Truong, C.J. Solomon, C. Calcagno, V. Mani, C.Y. Tang, W.J. Mulder, J.W. Murrough, U. Hoffmann, M. Nahrendorf, L.M. Shin, Z.A. Fayad, and R.K. Pitman. 2017. Relation between resting amygdalar activity and cardiovascular events: a longitudinal and cohort study. *The Lancet.* 389:834–845. doi:10.1016/S0140-6736(16)31714-7.
- Tawakol, A., R.Q. Migrino, G.G. Bashian, S. Bedri, D. Vermylen, R.C. Cury, D. Yates, G.M. LaMuraglia, K. Furie, S. Houser, H. Gewirtz, J.E. Muller, T.J. Brady, and A.J. Fischman. 2006. In Vivo 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Imaging Provides a Noninvasive Measure of Carotid Plaque Inflammation in Patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48:1818–1824. doi:10.1016/j.jacc.2006.05.076.
- Tchouate Gainkam, L.O., V. Caveliers, N. Devoogdt, C. Vanhove, C. Xavier, O. Boerman, S. Muyltermans, A. Bossuyt, and T. Lahoutte. 2011. Localization, mechanism and reduction of renal retention of technetium-99m labeled epidermal growth factor receptor-specific nanobody in mice. *Contrast Media Mol. Imaging.* 6:85–92. doi:10.1002/cmml.408.
- Teng, B., J.D. Smith, M.E. Rosenfeld, P. Robinet, M.E. Davis, R.R. Morrison, and S.J. Mustafa. 2014. A1 adenosine receptor deficiency or inhibition reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E deficient mice. *Cardiovasc. Res.* 102:157–165. doi:10.1093/cvr/cvu033.
- Tesfamariam, B., and R.A. Cohen. 1992. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am. J. Physiol.* 263:H321–326. doi:10.1152/ajpheart.1992.263.2.H321.
- The Emerging Risk Factors Collaboration. 2012. C-Reactive Protein, Fibrinogen, and Cardiovascular Disease Prediction. *N. Engl. J. Med.* 367:1310–1320. doi:10.1056/NEJMoa1107477.
- The HPS3/TIMI55–REVEAL Collaborative Group. 2017. Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 377:1217–1227. doi:10.1056/NEJMoa1706444.
- The SPRINT Research Group. 2015. A Randomized Trial of Intensive versus Standard Blood-Pressure Control. *N. Engl. J. Med.* 373:2103–2116. doi:10.1056/NEJMoa1511939.
- Thorne, S.A., S.E. Abbot, P.G. Winyard, D.R. Blake, and P.G. Mills. 1996. Extent of oxidative modification of low density lipoprotein determines the degree of cytotoxicity to human coronary artery cells. *Heart Br. Card. Soc.* 75:11–16.
- Thygesen, K., J.S. Alpert, H.D. White, et al. (USA. 2007. Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation.* 116:2634–2653. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.187397.
- Tian, Y., L.J. Sommerville, A. Cuneo, S.E. Kelemen, and M.V. Autieri. 2008. Expression and Suppressive Effects of Interleukin-19 on Vascular Smooth Muscle Cell Pathophysiology and Development of Intimal Hyperplasia. *Am. J. Pathol.* 173:901–909. doi:10.2353/ajpath.2008.080163.
- Tonino, P.A.L., W.F. Fearon, B. De Bruyne, K.G. Oldroyd, M.A. Leesar, P.N. Ver Lee, P.A. MacCarthy, M. van't Veer, and N.H.J. Pijls. 2010. Angiographic Versus Functional Severity of Coronary Artery Stenoses in the FAME Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55:2816–2821. doi:10.1016/j.jacc.2009.11.096.

- Tousoulis, D., E. Oikonomou, E.K. Economou, F. Crea, and J.C. Kaski. 2016. Inflammatory cytokines in atherosclerosis: current therapeutic approaches. *Eur. Heart J.* 37:1723–1732. doi:10.1093/eurheartj/ehv759.
- Townsend, N., L. Wilson, P. Bhatnagar, K. Wickramasinghe, M. Rayner, and M. Nichols. 2016. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur. Heart J.* 37:3232–3245. doi:10.1093/eurheartj/ehw334.
- Tricoci, P., D.M. D'Andrea, P.A. Gurbel, Z. Yao, M. Cuchel, B. Winston, R. Schott, R. Weiss, M.A. Blazing, L. Cannon, A. Bailey, D.J. Angiolillo, A. Gille, C.L. Shear, S.D. Wright, and J.H. Alexander. 2015. Infusion of Reconstituted High-Density Lipoprotein, CSL112, in Patients With Atherosclerosis: Safety and Pharmacokinetic Results From a Phase 2a Randomized Clinical Trial. *J. Am. Heart Assoc.* 4:e002171. doi:10.1161/JAHA.115.002171.
- Tsujita, K., S. Sugiyama, H. Sumida, H. Shimomura, T. Yamashita, K. Yamanaga, N. Komura, K. Sakamoto, H. Oka, K. Nakao, S. Nakamura, M. Ishihara, K. Matsui, N. Sakaino, N. Nakamura, N. Yamamoto, S. Koide, T. Matsumura, K. Fujimoto, R. Tsunoda, Y. Morikami, K. Matsuyama, S. Oshima, K. Kaikita, S. Hokimoto, and H. Ogawa. 2015. Impact of Dual Lipid-Lowering Strategy With Ezetimibe and Atorvastatin on Coronary Plaque Regression in Patients With Percutaneous Coronary Intervention. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66:495–507. doi:10.1016/j.jacc.2015.05.065.
- Tsujita, Y., M. Kuroda, K. Tanzawa, N. Kitano, and A. Endo. 1979. Hypolipidemic effects in dogs of ML-236B, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Atherosclerosis.* 32:307–313.
- Ulyanova, T. 2005. VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin. *Blood.* 106:86–94. doi:10.1182/blood-2004-09-3417.
- Valgimigli, M., H. Bueno, R.A. Byrne, et al. 2018. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS. *Eur. Heart J.* 39:213–260. doi:10.1093/eurheartj/ehx419.
- van der Valk, F.M., J.C. Sluimer, S.A. Vööl, H.J. Verberne, A.J. Nederveen, A.D. Windhorst, E.S.G. Stroes, P. Lambin, and M.J.A.P. Daemen. 2015. In Vivo Imaging of Hypoxia in Atherosclerotic Plaques in Humans. *JACC Cardiovasc. Imaging.* 8:1340–1341. doi:10.1016/j.jcmg.2014.12.015.
- Varga-Szabo, D., A. Braun, and B. Nieswandt. 2009. Calcium signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 7:1057–1066. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x.
- Varga-Szabo, D., I. Pleines, and B. Nieswandt. 2008. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:403–412. doi:10.1161/ATVBAHA.107.150474.
- Vengrenyuk, Y., S. Carlier, S. Xanthos, L. Cardoso, P. Ganatos, R. Virmani, S. Einav, L. Gilchrist, and S. Weinbaum. 2006. A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:14678–14683. doi:10.1073/pnas.0606310103.
- Vergnes, L., J. Phan, M. Strauss, S. Tafuri, and K. Reue. 2003. Cholesterol and Cholate Components of an Atherogenic Diet Induce Distinct Stages of Hepatic Inflammatory Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 278:42774–42784. doi:10.1074/jbc.M306022200.
- Verjans, J.W., E.A. Osborn, G.J. Ughi, M.A. Calton Press, E. Hamidi, A.P. Antoniadis, M.I. Papafaklis, M.F. Conrad, P. Libby, P.H. Stone, R.P. Cambria, G.J. Tearney, and F.A. Jaffer. 2016. Targeted Near-Infrared Fluorescence Imaging of Atherosclerosis. *JACC Cardiovasc. Imaging.* 9:1087–1095. doi:10.1016/j.jcmg.2016.01.034.

- Vestweber, D. 2015. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat. Rev. Immunol.* 15:692–704. doi:10.1038/nri3908.
- Viola, J., P. Lemnitzer, Y. Jansen, G. Csaba, C. Winter, C. Neideck, C. Silvestre-Roig, G. Dittmar, Y. Döring, M. Drechsler, C. Weber, R. Zimmer, N. Cenac, and O. Soehnlein. 2016. Resolving Lipid Mediators Maresin 1 and Resolvin D2 Prevent Atheroprogession in Mice. *Circ. Res.* CIRCRESAHA.116.309492. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309492.
- Virmani, R., A.P. Burke, A. Farb, and F.D. Kolodgie. 2006. Pathology of the vulnerable plaque. *J. Am. Coll. Cardiol.* 47:C13-18. doi:10.1016/j.jacc.2005.10.065.
- Virmani, R., F.D. Kolodgie, A.P. Burke, A. Farb, and S.M. Schwartz. 2000. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1262–1275.
- Vita, J.A., C.B. Treasure, E.G. Nabel, J.M. McLenachan, R.D. Fish, A.C. Yeung, V.I. Vekshtein, A.P. Selwyn, and P. Ganz. 1990. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation.* 81:491–497.
- Vöö, S., R.M. Kwee, J.C. Sluimer, F.H.B.M. Schreuder, R. Wiert, M. Bauwens, S. Heeneman, J.P.M. Cleutjens, R.J. van Oostenbrugge, J.-W.H. Daemen, M.J.A.P. Daemen, F.M. Mottaghy, and M.E. Kooi. 2016. Imaging Intraplaque Inflammation in Carotid Atherosclerosis With ¹⁸F-Fluorocholine Positron Emission Tomography–Computed Tomography. *CLINICAL PERSPECTIVE: Prospective Study on Vulnerable Atheroma With Immunohistochemical Validation.* *Circ. Cardiovasc. Imaging.* 9:e004467. doi:10.1161/CIRCIMAGING.115.004467.
- Waksman, R., R. Torguson, M.A. Spad, H. Garcia-Garcia, J. Ware, R. Wang, S. Madden, P. Shah and J. Muller. 2017. The lipid-rich plaque study of vulnerable plaque and vulnerable patients: Study design and rationale. *Am. Heart. J.* 192:98-104. doi:10.1016/j.ahj.2017.02.010.
- Wan, W., J.K. Lim, M.S. Lionakis, A. Rivollier, D.H. McDermott, B.L. Kelsall, J.M. Farber, and P.M. Murphy. 2011. Genetic deletion of chemokine receptor Ccr6 decreases atherogenesis in ApoE-deficient mice. *Circ. Res.* 109:374–381. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.242578.
- Wang, H., M. Naghavi, C. Allen, R.M. Barber, et al. 2016. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet.* 388:1459–1544. doi:10.1016/S0140-6736(16)31012-1.
- Wang, J., Y.-J. Geng, B. Guo, T. Klima, B.N. Lal, J.T. Willerson, and W. Casscells. 2002. Near-infrared spectroscopic characterization of human advanced atherosclerotic plaques. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39:1305–1313. doi:10.1016/S0735-1097(02)01767-9.
- Weber, C., S. Meiler, Y. Döring, M. Koch, M. Drechsler, R.T.A. Megens, Z. Rowinska, K. Bidzhekov, C. Fecher, E. Ribechini, M.A.M.J. van Zandvoort, C.J. Binder, I. Jelinek, M. Hristov, L. Boon, S. Jung, T. Korn, M.B. Lutz, I. Förster, M. Zenke, T. Hieronymus, T. Junt, and A. Zernecke. 2011. CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice. *J. Clin. Invest.* 121:2898–2910. doi:10.1172/JCI44925.
- Wen, C.P., J.P.M. Wai, M.K. Tsai, Y.C. Yang, T.Y.D. Cheng, M.-C. Lee, H.T. Chan, C.K. Tsao, S.P. Tsai, and X. Wu. 2011. Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *The Lancet.* 378:1244–1253. doi:10.1016/S0140-6736(11)60749-6.
- West, L.E., T. Steiner, H.M. Judge, S.E. Francis, and R.F. Storey. 2014. Vessel wall, not platelet, P2Y12 potentiates early atherogenesis. *Cardiovasc. Res.* 102:429–435. doi:10.1093/cvr/cvu028.

- Whiting, D.R., L. Guariguata, C. Weil, and J. Shaw. 2011. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 94:311–321. doi:10.1016/j.diabres.2011.10.029.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., A. Bartocci, A.W. Ferrante, A. Ahmed-Ansari, K.W. Sell, J.W. Pollard, and E.R. Stanley. 1990. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:4828–4832.
- Williams, K.J., and I. Tabas. 1995. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15:551–561.
- Wilson, P.W.F., R.B. D'Agostino, D. Levy, A.M. Belanger, H. Silbershatz, and W.B. Kannel. 1998. Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. *Circulation.* 97:1837–1847. doi:10.1161/01.CIR.97.18.1837.
- Wiviott, S.D., E. Braunwald, C.H. McCabe, G. Montalescot, W. Ruzyllo, S. Gottlieb, F.-J. Neumann, D. Ardissino, S. De Servi, S.A. Murphy, J. Riesmeyer, G. Weerakkody, C.M. Gibson, and E.M. Antman. 2007. Prasugrel versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *N. Engl. J. Med.* 357:2001–2015. doi:10.1056/NEJMoa0706482.
- Woodcock, J., O.H. Franco, N. Orsini, and I. Roberts. 2011. Non-vigorous physical activity and all-cause mortality: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Int. J. Epidemiol.* 40:121–138. doi:10.1093/ije/dyq104.
- Xi, B., S.P.Veeranki, M.Zhao, C.Ma, Y.Yann and J.Mi. 2017. Relationship of alcohol consumption to all causes, cardiovascular, and cancer-related mortality in U.S. adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* doi:10.1016/j.jacc.2017.06.054
- Yahagi, K., H.R. Davis, E. Arbustini, and R. Virmani. 2015. Sex differences in coronary artery disease: pathological observations. *Atherosclerosis.* 239:260–267. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.017.
- Yahagi, K., F.D. Kolodgie, F. Otsuka, A.V. Finn, H.R. Davis, M. Joner, and R. Virmani. 2016. Pathophysiology of native coronary, vein graft and in-stent atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* 13:79–98. doi:10.1038/nrcardio.2015.164.
- Yang, J.T., H. Rayburn, and R.O. Hynes. Cell adhesion events mediated by $\alpha 4$ integrins are essential in placental and cardiac development. 12.
- Ylä-Herttuala, S., B.A. Lipton, M.E. Rosenfeld, T. Särkioja, T. Yoshimura, E.J. Leonard, J.L. Witztum, and D. Steinberg. 1991. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:5252–5256.
- Yoshida, T., K.H. Kaestner, and G.K. Owens. 2008. Conditional Deletion of Kruppel-Like Factor 4 Delays Downregulation of Smooth Muscle Cell Differentiation Markers but Accelerates Neointimal Formation Following Vascular Injury. *Circ. Res.* 102:1548–1557. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.176974.
- Yuan, C., W.S. Kerwin, M.S. Ferguson, N. Polissar, S. Zhang, J. Cai, T.S. hatsumkami. 2002. Contrast-enhanced high resolution MRI for atherosclerotic carotid artery tissue characterization. *J magn reson imaging.* 15:62-67.
- Yusuf, S., F. Zhao, S.R. Mehta, S. Chrolavicius, G. Tognoni, K.K. Fox and clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events trials investigators. 2001. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndroms without ST-segment elevation. *N. Engl. J. Med.* 16:494-502. doi:10.1056/NEJMoa010746.

- Yusuf, S., S. Hawken, S. Ôunpuu, T. Dans, A. Avezum, F. Lanas, M. McQueen, A. Budaj, P. Pais, J. Varigos, and L. Lisheng. 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. 364:16.
- Yvan-Charvet, L., T. Pagler, E.L. Gautier, S. Avagyan, R.L. Siry, S. Han, C.L. Welch, N. Wang, G.J. Randolph, H.W. Snoeck, and A.R. Tall. 2010. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science*. 328:1689–1693. doi:10.1126/science.1189731.
- Zani, I., S. Stephen, N. Mughal, D. Russell, S. Homer-Vanniasinkam, S. Wheatcroft, and S. Ponnambalam. 2015. Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells*. 4:178–201. doi:10.3390/cells4020178.
- Zeller, M., P.G. Steg, J. Ravisy, Y. Laurent, L. Janin-Manificat, I. L’Huillier, J.-C. Beer, A. Oudot, G. Rioufol, H. Makki, M. Farnier, L. Rochette, B. Vergès, and Y. Cottin. 2005. Prevalence and Impact of Metabolic Syndrome on Hospital Outcomes in Acute Myocardial Infarction. 7.
- Zernecke, A. 2015. Dendritic Cells in AtherosclerosisSignificance: Evidence in Mice and Humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35:763–770. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303566.
- Zernecke, A., and C. Weber. 2014. Chemokines in Atherosclerosis: Proceedings Resumed. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34:742–750. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301655.
- Zhang, J., P. Alcaide, L. Liu, J. Sun, A. He, F.W. Lusinskas, and G.-P. Shi. 2011. Regulation of Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression by Mast Cells, Macrophages, and Neutrophils. *PLoS ONE*. 6:e14525. doi:10.1371/journal.pone.0014525.
- Zhang, S.H., R.L. Reddick, J.A. Piedrahita, and N. Maeda. 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 258:468–471.
- Zhou, X. 2005. Lesion Development and Response to Immunization Reveal a Complex Role for CD4 in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 96:427–434. doi:10.1161/01.RES.0000156889.22364.f1.
- Zhou, X., G. Paulsson, S. Stemme, and G.K. Hansson. 1998. Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J. Clin. Invest.* 101:1717–1725. doi:10.1172/JCI1216.
- Zimmer, S., A. Grebe, and E. Latz. 2015. Danger Signaling in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 116:323–340. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.301135.

Résumé

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde, et la maladie coronaire est responsable de la majorité de ces décès. L'infarctus du myocarde et l'AVC sont principalement causés par la rupture de plaques d'athérome vulnérables. Malgré les récentes avancées dans la prise en charge des patients, aucun outil non invasif n'est actuellement disponible en pratique clinique pour le diagnostic de ces lésions. Le laboratoire UMR_S1039 Radiopharmaceutiques Biocliniques a développé un agent d'imagerie innovant ciblant la molécule d'adhésion cellulaire VCAM-1, impliquée dans le processus inflammatoire qui caractérise les plaques vulnérables. ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 appartient à une nouvelle classe de radiotraceurs dérivés d'anticorps de camélidés possédant uniquement une chaîne lourde dont le domaine variable est appelé nanobody. Les lésions athéromateuses aortiques ont été visualisées avec succès par imagerie non invasive (SPECT) chez un modèle de souris déficient pour le gène ApoE. L'objectif de ma thèse a été double : finaliser la caractérisation préclinique de cAbVCAM1-5 et transférer ce radiotraceur vers la clinique. Dans un premier temps, la sensibilité de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 a été démontrée avec succès par l'utilisation de thérapies de référence (statine, ézetimibe). Ces résultats prometteurs nous ont permis d'évaluer le potentiel effet anti-athérogène de nouveaux agents thérapeutiques et d'initier le transfert en clinique de cet agent d'imagerie. cAbVCAM1-5 et l'intermédiaire de réaction utilisé pour son radiomarquage ont été produits selon les bonnes pratiques de fabrication (BPF). Ces deux produits ont été évalués et validés. De plus la méthode de radiomarquage a été optimisée dans la perspective de son transfert vers la clinique. L'étude de toxicité étendue à dose unique est en cours. A l'issue de cette thèse, le laboratoire INSERM U1039 dispose donc de tous les éléments nécessaires pour une demande d'autorisation de phase clinique I/IIa.

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading causes of death worldwide, and Coronary Artery Disease (CAD) is responsible for the majority of CVD deaths. Myocardial infarction and stroke are mainly caused by the rupture of vulnerable atherosclerotic plaques. Despite recent advances in treatment and detection of CAD, no non-invasive tool is currently available for the diagnosis of vulnerable plaques. The laboratory UMR_S1039 Radiopharmaceutiques Biocliniques has recently developed a new radiotracer (^{99m}Tc -cAbVCAM1-5) targeted to the inflammatory marker Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) expressed in vulnerable plaques. ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 belongs to a new class of radiotracers derived from single domain antibodies (sdAb), or nanobodies, that are composed of the single variable domain of the heavy chain antibodies of camelidae. Aortic plaques have been successfully visualized noninvasively by SPECT in an Apolipoprotein E (ApoE) deficient mouse model of atherosclerosis. The objectives of my thesis were to complete the preclinical characterization of cAbVCAM1-5 and to transfer this innovative tool to the clinic. The sensitivity of ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 imaging has been successfully demonstrated using gold standard therapies (statin, ezetimibe). Those good results allowed us to employ this imaging agent for the evaluation of new therapeutics and to initiate the clinical translation of cAbVCAM1-5. The productions of cAbVCAM1-5 and of the tricarbonyl employed for its radiolabeling have been performed according to good manufacturing practices (GMP). Both products have been evaluated and validated. Furthermore, the radiolabeling method has been optimized to facilitate its clinical transfer. Single dose toxicity study is currently ongoing. At the end of this PhD fellowship, the U1039 Laboratory therefore possesses all required products and knowledge for the onset of a first in human clinical trial.