HAL
open science

Développement d'un modèle physiopathologique de macrophages spumeux de l'athérosclérose : caractérisation phénotypique et fonctionnelle et sélection d'anticorps humains spécifiques

Coraline Borowczyk

▶ **To cite this version:**

Coraline Borowczyk. Développement d'un modèle physiopathologique de macrophages spumeux de l'athérosclérose : caractérisation phénotypique et fonctionnelle et sélection d'anticorps humains spécifiques. Imagerie médicale. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT : 2020BORD0243 . tel-03163355

HAL Id: tel-03163355

https://theses.hal.science/tel-03163355v1

Submitted on 9 Mar 2021

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

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

université de BORDEAUX

université de BORDEAUX

THESE PRESENTEE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEURE

DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Spécialité : Bioimagerie

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Par **Coraline Borowczyk**

Développement d'un modèle physiopathologique de macrophages spumeux de l'athérosclérose : caractérisation phénotypique et fonctionnelle et sélection d'anticorps humains spécifiques

Sous la direction de : Gisèle Clofent-Sanchez

Préparée au sein de l'UMR-5536 CNRS – Université de Bordeaux

Soutenue le 8 décembre 2020

Membres du jury :

M. Laurent Yvan-Charvet	Directeur de Recherche INSERM Université de Nice	Rapporteur
M. François Canonne-Hergaux	Chargé de Recherche INSERM Université de Toulouse	Rapporteur
M. Johan Garaude	Chargé de Recherche INSERM Université de Bordeaux	Examinateur
M. Pieter Goossens	Post-doctorant Maastricht UMC	Examinateur
Mme. Anne-Karine Bouzier-Sore	Directrice de Recherche CNRS Université de Bordeaux	Présidente du jury
Mme. Gisèle Clofent-Sanchez	Directrice de Recherche CNRS Université de Bordeaux	Directrice de thèse
Mme. Florence Ottones	Maître de Conférences Université de Bordeaux	Invitée

« La phrase la plus excitante à entendre en science, celle qui annonce de nouvelles découvertes, n'est pas eurêka (j'ai trouvé) mais plutôt tiens, c'est marrant … ».

Isaac Asimov

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à mes deux rapporteurs, le Dr. Laurent Yvan-Charvet et le Dr. François Canonne-Hergaux pour avoir pris le temps de juger mon travail malgré les impératifs de chacun. Je remercie également mes trois examinateurs, le Dr. Johan Garaude, le Dr. Pieter Goossens et le Dr. Anne-Karine Bouzier-Sore pour leur disponibilité et leur intérêt pour ces travaux. Je tiens à remercier le Dr. Johan Garaude pour nous avoir accueillies au sein de son laboratoire et pour les discussions sur les résultats des analyses métaboliques.

Je souhaite remercier sincèrement les Dr Sylvain Miraux et Anne-Karine Bouzier-Sore, Directeur et Directrice adjointe du CRMSB pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire ainsi que pour leur présence et leur confiance lors de cette première année compliquée qui m'ont permis de terminer sereinement cette thèse. Mille mercis Anne-Karine pour avoir toujours été disponible et à l'écoute.

Bien évidemment, j'adresse un grand merci au Dr. Gisèle Clofent-Sanchez pour m'avoir soutenue et encadrée pendant ces trois années. Je te remercie tout particulièrement pour avoir fait en sorte qu'on ne se fasse pas marcher sur les pieds plus d'une année, c'était difficile mais nécessaire. Je te remercie pour tous tes conseils et pour tes corrections pour ce manuscrit de thèse.

Je souhaite également remercier toute l'équipe. Le Dr. Florence Ottones pour m'avoir acceptée sur son projet, pour ses conseils, ses corrections pour ce manuscrit de thèse et, surtout, son exceptionnelle disponibilité malgré la vie de famille. Le Dr. Jeanny Laroche-Traineau pour sa disponibilité, son écoute, et sa rigueur expérimentale. Jeanny, je t'adresse un merci du fond du cœur, j'ai beaucoup aimé travailler avec toi, on a la même manière de fonctionner, que ce soit pour les manips ou pour tout ce qui va autour. Je te remercie d'avoir été là pour discuter lorsqu'il y a eu des hauts et des bas, d'avoir pris des nouvelles pendant le(s) confinement(s), d'avoir partagé cafés et recettes de cuisine, et plus récemment, pour les corrections pour ce manuscrit de thèse. Le Dr. Marie-Josée Jacobin-Valat pour sa bonne humeur quotidienne, ses conseils scientifiques et personnels, et ses corrections pour ce manuscrit de thèse. Je n'oublie pas le Dr. Cyril Lorenzato pour ses conseils et sa pédagogie exceptionnelle ! J'aurais bien aimé que tu restes pendant ces trois années. Merci également à Samuel Bonnet, Dr Samuel Bonnet ! pour ses conseils et sa présence pendant nos deux années de thèse communes. Et j'espère qu'on va bientôt pouvoir reprendre nos discussions et réflexions ! Je voudrais également remercier Paul Marteau, même si tu n'as été là que six mois, cela restera la meilleure période de ma thèse, c'est tellement plus stimulant et agréable de travailler avec quelqu'un avec qui on est sur la même longueur d'onde et pouvoir parler de tout et de rien ! Je te souhaite toutes les meilleures vagues du monde !

J’aimerais remercier tous les autres membres du laboratoire pour leur écoute et conseils, ainsi que pour les repas partagés le midi avant que vous ne déménagiez. Tout particulièrement mes collègues (ex)doctorants, Colleen, Ursule, Stéphane, Angélique, Thibaut, Aimé, Samuel (encore), Sarah. On a eu une chance incroyable de pouvoir faire notre thèse dans le même laboratoire, et de s’être aussi bien entendus.

Je souhaite remercier Sébastien Marais pour toutes les séances d’imagerie au BIC et sa bonne humeur, c’était un plaisir !

Je remercie également Aurélia Brillac qui m’a formée aux manips de Seahorse et dosage de l’ATP. Merci pour ta disponibilité !

J’ai une grande pensée pour toute ma famille et mes amis que je n’ai malheureusement pas pu voir autant que j’aurais aimé pendant ces trois ans. Merci de m’avoir soutenue à distance, et j’ai vraiment hâte de vous revoir… J’aurais aimé que vous puissiez assister à la soutenance, mais j’ai peur que ce ne soit pas possible, confinement oblige.

Vous avez été ma petite famille à Bordeaux, toujours présents et attentifs les uns aux autres, et partageant cette passion commune. Vous n’imaginez pas le bien que c’était de venir vous voir et de s’entrainer ensemble, une vraie bouffée d’oxygène ! Vous m’avez permis de garder bonne humeur et motivation, ce qui était nécessaire à la réussite de cette thèse. Merci du fond du cœur à toutes et tous du groupe sprint/haies de Bordeaux athlé !!

Enfin, merci à toi David. Merci pour ton soutien sans faille, ta patience et ton amour. Ça n’a pas été facile de tenir jusqu’au bout, mais c’est bon on va (enfin) pouvoir commencer à construire quelque chose ensemble.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS 11

LISTE DES FIGURES 13

LISTE DES TABLEAUX 15

AVANT-PROPOS 17

INTRODUCTION GENERALE 19

CHAPITRE I : L'ATHEROSCLEROSE 20

I. PETIT PRELUDE HISTORIQUE 20

II. DEFINITION ET MANIFESTATIONS CLINIQUES 20

III. EPIDEMIOLOGIE ET CONSEQUENCES ECONOMIQUES 21

IV. ATHEROGENESE 22

IV. A. LES ACTEURS 22

IV. A. 1) La paroi artérielle 22

IV. A. 2) Les éléments sanguins 25

IV. A. 3) Les plaquettes 25

IV. A. 4) Les cellules immunitaires 26

IV. A. 5) Les lipoprotéines 28

IV. A. 6) Les enzymes et médiateurs 31

IV. A. 7) Le fer 32

IV. B. INITIATION DES LESIONS 33

IV. B. 1) Forces de cisaillement, accumulation de LDL et stress oxydant 33

IV. B. 2) Recrutement des cellules immunitaires et élimination des LDL oxydées 35

IV. B. 3) Progression des lésions et formation de la plaque 36

IV. B. 4) Evolution de la plaque 37

V. OUTILS DIAGNOSTIQUES ET METHODES THERAPEUTIQUES 38

V. A. DIAGNOSTICS ACTUELS 38

V. A. 1) Traitements chirurgicaux 39

VI. OBJECTIFS THERAPEUTIQUES 41

REFERENCES : 42

CHAPITRE II : MONOCYTES ET MACROPHAGES 48

I. SECOND PRELUDE HISTORIQUE 48

II. MONOCYTES ET MACROPHAGES, CELLULES DU SYSTEME DES PHAGOCYTES MONONUCLEES 49

II. A. ORIGINES DES MACROPHAGES 49

II. A. 1) Monocytopoïèse et hétérogénéité monocytaire 49

II. A. 2) Origine embryonnaire : macrophages résidents 52

II. B. HETEROGENEITE PHENOTYPIQUE ET FONCTIONNELLE DES MACROPHAGES 53

II. B. 1) Fonctions des macrophages 53

II. B. 2) Distinction fonctionnelle entre les MDM et les macrophages résidents 55

II. B. 3) Description et rôles des principaux modèles de macrophages 56

III. MACROPHAGES ET PLAQUES D'ATHEROSCLEROSE 58

III. A. LOCALISATIONS ET FONCTIONS DES MACROPHAGES DANS L'ATHEROSCLEROSE 59

III. B. HETEROGENEITE PHENOTYPIQUE ET ONTOGENIQUE DES MACROPHAGES DANS LA PLAQUE 60
III. B. 1) Origine des macrophages spumeux 60
III. B. 2) Discussion sur le phénotype des macrophages spumeux 62

RÉFÉRENCES : 65

CHAPITRE III : METABOLISME ET MACROPHAGES 71

I. PRINCIPES DU METABOLISME ET SUBSTRATS ENERGETIQUES 71

I. A. METABOLISME ENERGETIQUE 71
I. B. PRODUITS ET SUBSTRATS 72
I. B. 1) ATP 72
I. B. 2) Glucose 72
I. B. 3) Acides gras 74
I. B. 4) Acides aminés 75
I. B. 5) Intermédiaires du métabolisme transporteurs d'électrons 75

II. VOIES DU METABOLISME ENERGETIQUE 77

II. A. GLYCOLYSE 77
II. B. VOIE DES PENTOSES PHOSPHATES 77
II. C. β-OXYDATION DES ACIDES GRAS 78
II. D. CYCLE DE KREBS 80
II. E. CHAINE RESPIRATOIRE, SYNTHESE D'ATP ET STRESS OXYDANT 81
II. F. NEOGLUCOGENESE 82
II. G. LES ACIDES AMINES 83
II. G. 1) Catabolisme de l'isoleucine et de la valine 83
II. G. 2) Glutaminolyse : 83
II. G. 3) Métabolisme de l'arginine : 83
II. G. 4) Métabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine 84
II. G. 5) Métabolisme de la glycine 84
II. H. SYNTHESE DES ACIDES GRAS 84

III. METABOLISME DES MACROPHAGES 86

III. A. MACROPHAGES PRO-INFLAMMATOIRES 86
III. B. MACROPHAGES IMMUNOREGULATEURS 89
III. C. METABOLISME DANS LES PLAQUES D'ATHEROME ET MACROPHAGES SPUMEUX 92

RÉFÉRENCES : 95

CHAPITRE IV : LES ANTICORPS 100

I. GENERALITES 100

I. A. DECOUVERTE DES ANTICORPS 100
I. B. STRUCTURE ET FONCTIONS DES ANTICORPS 101
I. B. 1) Structure de base 101
I. B. 2) Domaines constants 102
I. B. 3) Domaines variables 102
I. B. 4) Différentes classes d'immunoglobulines 103
I. C. DIVERSITE DES ANTICORPS 104
I. C. 1) Diversité génique 104
I. C. 2) Diversité combinatoire : production par les lymphocytes B 105
I. C. 3) Flexibilité jonctionnelle et hypermutations somatiques 107

II. LES ANTICORPS COMME OUTILS 108

II. A. INGENIERIE DES ANTICORPS 110

II. A. 1) Humanisation des anticorps *110*
II. A. 2) Les différents formats *110*
II. A. 3) Phage-display *112*
II. A. 4) Application des anticorps au développement d'outils diagnostique et thérapeutiques *118*

RÉFÉRENCES : **122**

MATERIEL & METHODES **125**

I. CULTURE CELLULAIRE **126**

I. A. ISOLEMENT DES PBMCS 126
I. B. ISOLEMENT DES MONOCYTES 126
I. C. CULTURE DES MACROPHAGES 127
I. C. 1) Différenciation des monocytes en macrophages *127*
I. C. 2) Stimulation des macrophages : obtention des différents modèles *127*

II. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES MACROPHAGES **128**

II. A. ETUDE DE LA MORPHOLOGIE ET DU CONTENU EN LIPIDES 128
II. B. ETUDE DES MARQUEURS DE SURFACE PAR CYTOMETRIE EN FLUX 128

III. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DES MACROPHAGES : DOSAGE DES CYTOKINES **131**

IV. CARACTERISATION METABOLIQUE DES MACROPHAGES **132**

IV. A. DETECTION D'INTERMEDIAIRES DU METABOLISME (NADH ET FAD) PAR IMAGERIE BI-PHOTONIQUE 132
IV. B. RESPIRATION CELLULAIRE PAR ANALYSE DES FLUX CELLULAIRES 132
IV. C. DOSAGE DE L'ATP 134

V. PHAGE-DISPLAY SUR LE MODELE DE MACROPHAGES SPUMEUX **135**

V. A. BANQUE UTILISEE 135
V. B. ETAPES DE LA SELECTION PAR PHAGE-DISPLAY 137
V. C. CRIBLAGE *IN VITRO* DES PHAGE-SCFVS PAR ELISA 139
V. C. 1) Production des phage-scFvs *139*
V. C. 2) Dosage des phage-scFvs produits (ELISA) *140*
V. C. 3) Criblage des phage-scFvs (ELISA) *140*

RÉFÉRENCES : **141**

RESULTATS & DISCUSSION **142**

OBJECTIFS DE LA THESE : **143**

I. ETUDE DU MODELE DE MACROPHAGES SPUMEUX **145**

I. A. COMPARAISON DE NOTRE MODELE PHYSIOPATHOLOGIQUE DE MACROPHAGES SPUMEUX AVEC LES MODELES M1 ET M2 .. 145
I. A. 1) Etude de leur morphologie et analyse de leur prise en charge des LDLox, après coloration par microscopie en contraste de phase *145*
I. A. 2) Etude de l'expression des marqueurs inflammatoires et immunorégulateurs *147*
I. A. 3) Etude des cytokines de type 1 et de type 2 produites dans les surnageants cellulaires et dosées par ELISA *153*
I. A. 4) Comparaison de leur métabolisme *154*
I. A. 5) Conclusion sur l'étude des macrophages spumeux et leur comparaison avec les modèles M1 et M2 ..... *162*
I. B. COMPARAISON DES DIFFERENTS MODELES DE MACROPHAGES SPUMEUX 163
I. B. 1) Comparaison des marqueurs de surface *163*
I. B. 2) Dosage des cytokines dans les extraits carotidiens *168*
I. B. 3) Comparaison des différents modèles de macrophages spumeux par rapport à leurs propriétés optiques *169*

I. B. 4) Conclusion sur les différents modèles de macrophages spumeux *171*

II. SELECTION D'ANTICORPS PAR PHAGE-DISPLAY **172**

II. A. BIOPANNING ET SELECTION DES PHAGES-SCFVS 172
II. B. CRIBLAGE *IN VITRO* DES PHAGE-SCFVS PAR ELISA 173
II. C. CONCLUSION SUR LA SELECTION PAR PHAGE-DISPLAY 177

RÉFÉRENCES : **177**

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES **181**

REFERENCES : **187**

ANNEXES **189**

ANNEXE 1 : VALEURS BRUTES DU DOSAGE DE CYTOKINES **190**

ANNEXE 2 : ARTICLE **191**

Liste des abréviations

AASS : Aspartate ArginoSuccinate Shunt

ABCA1/G1 : ATP-Binding Cassette Transporter A1 ou G1

ACAT-1 : Acyl-CoA :cholesterol Acyl-Transferase 1

ADCC : Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity

ADCP : Antibody Dependant Cellular Phagocytosis

Apo : Apolipoprotéine

ATGL : Adipose TriacylGlycérol Lipase

ATP : Adénosine 5'-TriPhosphate

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BCR : B-Cell Receptor

CARKL : CArbohydrate Kinase-Like protein

CCCP : Carbonyl Cyanide m-Chloro-Phenyl hydrazone

CDC : Complement Dependant Cytotoxicity

CDR : Complementarity Determining Regions

CETP : CholesterylEster Transfer Protein

CFU : Colony Forming Unit

CH : Domaine constant de la chaîne lourde

CL : Domaine constant de la chaîne légère

CM : Chylomicrons

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CML : Cellules Musculaires Lisses

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CPT : Carnitine Palmitoyl Transférase

DO : Densité Optique

ECAR : ExtraCellular Acidification Rate

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EMA : European Medicines Agency

eNOS : endothelial Nitric Oxyde Synthase

Fab : Fragment antigen binding

FABP : Fatty-Acid Binding Protein

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FcRn : neonatal Fc Receptor

FDA : Food and Drug Administration

FR : Framework Region

GLUT2 : GLUcose Transporter 2

HDL : High Density Lipoprotein

HK1 : Hexokinase 1

HRP : HorseRadish Peroxidase

ICAM : InterCellular Adhesion Molecules

IDH : Isocitrate DésHydrogénase

IDL : Intermediate Density Lipoprotein

Ig : Immunoglobuline

IHC : Immunohistochimie

iNOS : inducible Nitric Oxyde Synthase

KLF2 : Krüppel-Like Factor 2

LAL : Lysosomal Acid Lipase

LCAT : Lécithine Cholestérol AcylTransférase

LDL(R) : Low Density Lipoprotein (Receptor)

LDLox : Low Density Lipoprotein oxydées

LEE : Limitante Elastique Externe

LEI : Limitante Elastique Interne

LFA1 : Lymphocyte Function-associated Antigen 1

LOX1 : (Lectin-type OXidized LDL receptor 1

LPL : Liporotéine Lipase

LPS : Lipopolysaccharide

LXR : Liver X Receptor

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MARCO : MAcrophage Receptor with COllagenase structure

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1

M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor

MDM : Monocyte-Derived Macrophages

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MFI : Mean Fluorescence Intensity

MMPs : Métalloprotéinases

MOI : Multiplicity Of Infection

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit

NO : Oxyde nitrique

NOX2 : NADPH oxidase

OCR : Oxygen Rate Consumption

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPD : O-Phenylenediamine Dihydrochloride

ORR : Optical Redox Ratio

OXPHOS : Phosphorylation oxidative

PAF : Platelet Activating Factor

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PBMCs : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFA : Paraformaldehyde

PFK-1 : PhosphoFructoKinase-1

PKM2 : Pyruvate Kinase isoform2

PPAR : Peroxisone Proliferator-Activated Receptor

PRR : Pathogen Recognition Receptor

PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand 1

RC : Récepteur au Complément

RFc : Récepteur au Fragment constant des immunoglobulines

ROS : Reactive Oxygen Species

SR-A1/B1/EC1 : Scavenger Receptor A1 ou B1 ou EC1

scFv : single-chain Fragment variable

SDH : Succinate DésHydrogénase

SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Protein

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TPEF : Two-Photon Excited Fluorescence

Trem2 : Triggered receptor expressed on myeloid cells 2

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VH : Domaine variable de la chaîne lourde

VL : Domaine variable de la chaîne légère

VLA4 : Very Late Antigen 4

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

VPP : Voie des Pentoses Phosphates

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la structure d'une artère, inspiré de la Fédération Française de Cardiologie 22
Figure 2 : Schéma général d'une lipoprotéine 28
Figure 3 : Schéma du transport des lipides par les lipoprotéines 29
Figure 4 : Etapes dans l'arrêt et la transmigration des macrophages à travers l'endothélium 32
Figure 5 : Réponse cellulaire au type de flux sanguin 34
Figure 6 : Schéma général de la formation et de la rupture d'une plaque 37
Figure 7 : Pose d'un stent 39
Figure 8 : Etapes de retrait chirurgical d'une plaque d'athérome par endartériectomie 40
Figure 9 : Hématopoïèse 49
Figure 10 : Passage de l'endothélium par les monocytes 50
Figure 11 : Macrophages résidents et MDM dans les maladies cardiovasculaires 56
Figure 12 : Activateurs et fonctions des différents modèles de macrophages 57
Figure 13 : Distinction fonctionnelle macrophages spumeux et inflammatoires. 63
Figure 14 : Représentation des clusters étudiés chez l'Homme 64
Figure 15 : Structure de l'ATP 72
Figure 16 : Structure du glucose, et des oligosaccharides et polysaccharides 73
Figure 17 : Structure et provenance des acides gras 74
Figure 18 : Structure générale des acides aminés 75
Figure 19 : Structure du NAD+ et du NADH 76
Figure 20 : Structure du FAD et FADH2 76
Figure 21 : Interactions entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. 78
Figure 22 : Libération d'acides gras à partir de triacylglycérol et β-oxydation des acides gras 79
Figure 23 : Cycle de Krebs 80
Figure 24 : Complexes de la chaîne respiratoire et synthèse de l'ATP 81
Figure 25 : Néoglucogenèse 82
Figure 26 : Métabolisme de l'arginine 83
Figure 27 : Synthèse des acides gras 84
Figure 28 : Interactions entre les voies métaboliques. 85
Figure 29 : Inhibitions du cycle de Krebs et dérivations métaboliques dans les M1 87
Figure 30 : Voies métaboliques des macrophages pro-inflammatoires M1. 88
Figure 31 : Voies métaboliques des macrophages pro-inflammatoires M2. 90
Figure 32 : Métabolisme des macrophages spumeux. 94
Figure 33 : Représentation schématique d'une immunoglobuline de type IgG 101
Figure 34 : Représentation des régions hypervariables 103
Figure 35 : Synthèse d'une chaîne lourde (A) et d'une chaîne légère (B) d'une immunoglobuline 106
Figure 36 : Lymphopoïèse et production d'anticorps 107
Figure 37 : Technique de mise au point des hybridomes 109
Figure 38 : Humanisation des anticorps 110
Figure 39 : Représentation des différents formats de fragments d'anticorps thérapeutiques 111
Figure 40 : Structure du phage M13 et son génome 114
Figure 41 : Représentation schématique de la production de phage-scFvs 115
Figure 42 : Schéma des étapes de sélection du phage-display 116
Figure 43 : Marché et pipeline des anticorps thérapeutiques en France 119
Figure 44 : Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux 129
Figure 45 : Courbe représentative de la mesure de la consommation d'oxygène par Seahorse 134

Figure 46 : Schéma de la sélection de phage-scFvs par phage-display dans le modèle de lapin athéromateux 136
Figure 47 : Schéma de la sélection sur macrophages spumeux à partir de la sélection dans le lapin.136
Figure 48 : Marquage des lipides cellulaires au Oil red O 146
Figure 49 : Analyse de la présence des marqueurs inflammatoires et immunorégulateurs à la surface des macrophages issus des différents modèles 149
Figure 50 : Analyse du niveau d'expression des marqueurs inflammatoires et immunorégulateurs à la surface des macrophages issus des différents modèles 150
Figure 51 : Superpositions des nuages de points des macrophages stimulés par l'IFN-γ+LPS (M1), l'IL-4+IL-13 (M2) ou les LDLox+EC (macrophages spumeux) après multi-marquage et passage en cytométrie en flux 151
Figure 52 : Profil cytokinique dans les surnageants cellulaires des macrophages..... 153
Figure 53 : Lectures optiques de l'autofluorescence du NADH et du FAD dans les macrophages 155
Figure 54 : Mesure et analyse de la fluorescence NADH et FAD en fonction de la polarisation des macrophages 156
Figure 55 : Courbes représentatives de la mesure de l'OCR (oxygen consumption rate) 157
Figure 56 : Respiration et glycolyse basales 159
Figure 57 : Proportion d'ATP mitochondrial et non mitochondrial..... 160
Figure 58 : Variations interindividuelles du dosage de l'ATP 160
Figure 59 : Analyse multimarquage..... 164
Figure 60 : Dosage des cytokines dans le pool d'extraits carotidiens. 168
Figure 61 : Représentation de l'autofluorescence du NADH, du FAD, de l'ORR et ACP..... 169
Figure 61 : ACP sur les données de cytométrie et d'imagerie biphotonique (NADH/FAD) 171
Figure 63 : Représentation en histogramme du criblage par ELISA (exemple de la première moitié d'une plaque)..... 175
Figure 64 : Représentation en histogramme du criblage par ELISA (exemple de la deuxième moitié d'une plaque)..... 175

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de lipoprotéines 28
Tableau 2 : Technique chirurgicale employée en fonction de l'artère à traiter 40
Tableau 3 : Comparaison entre les sous-classes de monocytes humains et murins 52
Tableau 4 : Différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines (Ig) 103
Tableau 5 : Nombre de gènes V, D et J codant pour les chaînes légères κ et λ, et pour les chaînes lourdes 105
Tableau 6 : Comparaison entre la technologie des hybridomes et celle du phage-display 112
Tableau 7 : Avantages comparatifs des systèmes de production d'anticorps monoclonaux 117
Tableau 8 : Panel des anticorps spécifiques des macrophages pro- et anti-inflammatoires 129
Tableau 1 : Marqueurs utilisés dans la littérature pour caractériser les modèles M1 et M2 152
Tableau 10 : Comparaison des propriétés spectrales du FAD et des lipofuscines/céroïdes 162
Tableau 11 : Production de phage-scFvs par tour de sélection 173

Avant-propos

Ce projet de recherche s'intègre dans le cadre de la thématique « ciblage de la plaque d'athérome », portée par le Dr Gisèle Clofent-Sanchez au sein du Centre de Résonnance Magnétique des Système Biologiques (UMR-5536). Cette thématique regroupe plusieurs disciplines (physique, biologie, chimie) et collaborations dans l'objectif de développer des stratégies thérapeutiques et/ou diagnostiques innovantes pour l'athérosclérose. Mon projet de thèse s'inscrit donc dans un travail d'équipe au cours duquel j'ai pu acquérir des connaissances, grâce à l'expertise de chacun, sur la culture de cellules humaines, sur le phénotypage par cytométrie en flux, sur l'étude du métabolisme par Seahorse, sur la microscopie à fluorescence bi-photonique et sur le phage-display.

Au cours de ces quatre chapitres d'introduction, j'ai voulu donner un aperçu des connaissances qu'il m'a été nécessaire d'acquérir pour approfondir ce projet de thèse, mais également donner quelques pistes sur les questions et contradictions qui existent à ce jour et qui montrent bien dans quel contexte de recherche se trouve ce projet. Dans un premier temps, j'ai voulu présenter les acteurs et les étapes du processus d'athérogenèse, ainsi que les méthodes de diagnostic actuellement utilisées. L'évolution des connaissances sur les plaques d'athérome ont permis de montrer que ce n'est pas tant l'aspect sténosant des plaques, mais sa composition cellulaire qui joue un rôle déterminant dans la rupture des plaques. C'est pourquoi les méthodes de diagnostic actuelles se basant uniquement sur le degré de sténose des plaques sont insuffisantes. J'ai ensuite voulu accorder un chapitre entier à la présentation des monocytes/macrophages car ce sont les cellules majoritaires dans la plaque et responsables de l'élimination des lipides. J'ai terminé ce chapitre par les questions actuelles qui se posent sur l'origine des macrophages de la plaque ainsi que sur l'origine des macrophages spumeux. Dans un troisième temps, j'ai abordé le métabolisme cellulaire via les différentes voies métaboliques afin de présenter le métabolisme des macrophages ainsi que les interrogations qui restent encore d'actualité sur les macrophages spumeux. Pour terminer cette introduction, j'ai présenté les anticorps et leur utilisation en thérapie et en tant qu'outils de diagnostic.

A la suite de cette introduction bibliographique, je présenterai le matériel et les méthodes utilisés suivi des résultats obtenus en même temps qu'une discussion, avant de terminer par une conclusion et des perspectives sur le projet. Les résultats se divisent en plusieurs parties, tout d'abord le développement et la caractérisation du modèle de macrophages spumeux, caractérisation faite au niveau du phénotype (par cytométrie en flux) et au niveau métabolique (par microscopie bi-photonique et par Seahorse). Et dans une seconde partie, la sélection d'anticorps par phage-display sur le modèle de macrophages spumeux.

Le but est d'étudier les macrophages spumeux et de sélectionner des anticorps spécifiques des macrophages spumeux qui pourront être utilisés pour le développement d'outils diagnostic et thérapeutiques.

Cette thèse a abouti à un article publié dans la revue Atherosclerosis en juillet 2020.

Introduction générale

Chapitre I : L'athérosclérose

I. Petit prélude historique

L'athérosclérose est considérée comme une maladie des temps modernes, causée par notre mode de vie combinant de nombreux facteurs de risque tels qu'une alimentation trop riche en lipides, un manque d'exercice physique et un environnement stressant. Toutefois, cette affection touche les Hommes depuis bien plus longtemps. En effet, il a été découvert des plaques d'athérome sur des momies provenant d'Egypte, du Pérou, du sud-ouest de l'Amérique du Nord et d'Alaska, datant parfois de plus de 4000 ans (1) ! L'observation de ces troubles vasculaires a commencé probablement avec Leonard de Vinci au début du XVIe siècle. Celui-ci déduisit, d'après une autopsie sur une personne âgée, que « [la mort] était provoqué[e] par le rétrécissement continu du passage des vaisseaux par l'épaississement des manteaux de ces vaisseaux » (2). Depuis, la dénomination de cette maladie n'a cessé d'évoluer jusqu'en 1904 où Marchand invente le terme « athérosclérose », du grec "athero", signifiant bouillie, et "sclérose", signifiant durcissement (3).

II. Définition et manifestations cliniques

En 1958, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a statué sur une définition de l'athérosclérose comme étant : « une association variable de remaniements de l'intima des artères (en tant que distinctes des artérioles) consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts de calcium, le tout accompagné de modifications de la média" (4). Cette définition est cependant uniquement histologique, elle ne prend pas en compte l'importance de l'inflammation. Actuellement, on considère que l'athérosclérose est plutôt un processus inflammatoire chronique de la paroi artérielle en réponse à des agressions mécaniques, biochimiques et/ou infectieuses. L'inflammation conduit à des remaniements tissulaires au niveau de la paroi artérielle créant une dysfonction endothéliale qui favorise l'accumulation de lipides, responsable du développement des plaques d'athérome. En effet, ces lipides vont progressivement être oxydés par des molécules libérées par l'inflammation, telles que des ROS (*Reactive Oxygen Species*), et soutenir cette inflammation par leur action pro-inflammatoire sur les cellules endothéliales. Les plaques sont donc d'abord composées de lipides, puis de cellules mortes chargées en lipides formant un cœur nécrotique qui finit par se calcifier et s'entourer d'une chape

fibreuse. Les plaques, selon leur composition, peuvent grossir plus ou moins et obstruer le vaisseau diminuant ainsi le flux sanguin, induisant une fatigue à l'effort. Elles peuvent également, dans certains cas, se rompre et provoquer un thrombus, lequel va être responsable d'accidents vasculaires cérébraux (AVC), d'infarctus du myocarde (IDM) ou d'artériopathies oblitérantes des membres inférieurs (AOMI).

III. Epidémiologie et conséquences économiques

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité au monde, avec presque 18 millions de décès en 2016, soit environ 31% des décès (contre 27% en 2000) (5). L'athérosclérose, considérée comme la principale cause des maladies cardiovasculaires, est responsable à elle seule d'environ 15 millions de décès, soit 27% des décès au niveau mondial (5). Au sein de l'Union Européenne, les maladies cardiovasculaires sont responsables de presque 2 millions de mort par an, soit 37% des décès. Elles coûtent en moyenne 210 milliards d'euros par an : 53% pour les soins médicaux, 26% pour la perte de productivité et 21% pour les soins informels (ce sont les soins que les soignants prodiguent à leurs proches atteints d'une maladie cardiovasculaire) (6). Il est donc urgent de mettre au point de nouvelles méthodes de diagnostic et de traitement plus spécifiques que ceux proposés actuellement.

Les plaques d'athérome sont très fréquentes ; nous en sommes tous porteurs, et ce dès l'enfance (7–9). L'apparition des premières atteintes sont appelées « stries lipidiques ». C'est à partir de 30-40 ans, sous la pression de nombreux facteurs de risque, que les plaques se développent. L'âge est le principal facteur de risque, viennent ensuite les facteurs de risque génétiques, tels que le genre, le diabète, l'obésité et l'hypertension, ainsi que les facteurs environnementaux, tels que le tabac, un mode de vie avec peu d'activité physique, une mauvaise alimentation (de type fast-food) et le manque de sommeil. Les hommes ont tendance à être légèrement plus touchés par cette maladie que les femmes (50,7% des décès sont des hommes et 49,3% sont des femmes (5)). L'environnement joue, lui aussi, un rôle déterminant puisqu'il peut soit aggraver les facteurs de risque génétiques, soit les diminuer. Le principal facteur de risque environnemental est le tabagisme ; plus de 80 % des sujets présentant un infarctus du myocarde avant 45 ans sont fumeurs (10). Le tabac agit à plusieurs niveaux en aggravant la dysfonction endothéliale, l'inflammation (augmentation des leucocytes circulants) et en modifiant le profil lipidique (diminution des HDL). Un niveau élevé d'activité physique permet une réduction des décès de 30 % (11), et une activité physique régulière permet de diminuer l'inflammation chronique chez les personnes ayant de nombreux facteurs de risque (12). Les besoins de base comme

l'alimentation et le sommeil ont, évidemment, un impact non négligeable sur le développement des plaques d'athérome lorsqu'ils ne sont pas respectés. En effet, il a été montré dans de nombreuses études (13–15) que les acides gras essentiels de type ω-3 et ω-6 doivent être consommés de manière à avoir un ratio ω-6/ω-3 inférieur ou égal à 5 ; les ω-6 étant à l'origine de la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires tandis que les ω-3 sont précurseurs de médiateurs lipidiques anti-inflammatoires. On retrouve les ω-6 dans les huiles de tournesol et d'arachide, les viandes et les produits industriels, et les ω-3 dans les poissons gras (sardines, saumon), le foie de morue, de nombreuses noix et dans les œufs fermiers. Or, dans le régime occidental, le ratio consommé a plutôt tendance à être compris entre 5 et 20, notamment à cause des fast-foods et des plats préparés, ce qui explique l'augmentation de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques telles que l'athérosclérose (16). *Last but not least*, un manque de sommeil (considéré comme inférieur à 7-8h/nuit) ou un mauvais sommeil augmente considérablement le risque de développer des plaques d'athérome, voire augmente significativement la taille des plaques par rapport à des patients ayant un sommeil réparateur (17–19).

IV. Athérogenèse

IV. A. Les acteurs

IV. A. 1) La paroi artérielle

La paroi artérielle est organisée en trois couches, ou tuniques, morphologiquement distinctes, appelées, de la partie la plus interne à celle la plus externe : l'*intima*, la *media* et l'*adventice* (Figure 1).

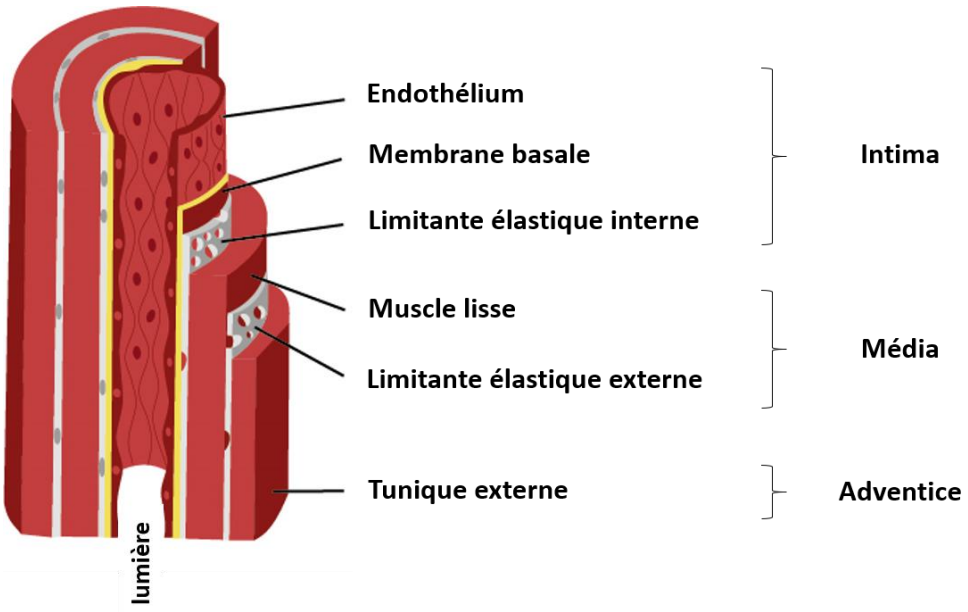


Figure 1 : Schéma de la structure d'une artère, inspiré de la Fédération Française de Cardiologie

L'**intima** est composée de l'endothélium, de la membrane basale et de la limitante élastique interne (LEI). L'endothélium est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées formant ainsi une barrière physiologique. Cette barrière joue un rôle essentiel dans le tonus vasculaire, la régulation de la coagulation et la défense de l'hôte via ses propriétés anti-inflammatoires (20). Les cellules endothéliales sont donc le premier contact avec les éléments présents dans le sang, elles doivent être capables d'en détecter les variations de concentration et d'y répondre. Ainsi, elles possèdent de nombreux récepteurs spécifiques à leur surface. Le rôle principal des cellules endothéliales est, tout d'abord, de détecter la présence de flux sanguin et de quelle manière il s'écoule. En effet, il a été montré que si le flux sanguin s'arrête, les cellules endothéliales vont entrer en apoptose et le vaisseau qui n'est plus irrigué va disparaître (21). Elles peuvent également induire la synthèse de nouveaux vaisseaux sanguins, c'est ce qu'on appelle l'angiogenèse. Qu'ils soient physiologiques (cicatrisation, développement embryonnaire) ou pathologiques (cancer, athérosclérose, inflammation chronique), les processus d'angiogenèse sont souvent déclenchés par des signaux d'hypoxie (absence d'oxygène) et/ou d'inflammation, ou par la présence de facteurs de croissance (22,23). Ensuite, les cellules endothéliales sont capables de distinguer les différentes contraintes de cisaillement induites par le flux sanguin ; il existe des flux « laminaires » ou des flux « turbulents ». Ce dernier est souvent présent au niveau des embranchements, là où se développent les plaques d'athérome. Pour détecter ces variations de flux, les cellules endothéliales possèdent des mécanorécepteurs, tels que les intégrines, les canaux ioniques, les protéines G hétérotrimériques, les récepteurs à activité tyrosine kinase et la NADPH oxydase (24). L'activité vasorégulatrice est gérée par le système nerveux autonome (indépendant de notre volonté) qui active les cellules musculaires lisses (CML) via la libération de neurotransmetteurs. Cependant, la vasorégulation peut également être induite de manière indirecte via les cellules endothéliales qui captent certaines substances vasoactives circulant dans le sang, telles que l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline (vasodilatatrices) ainsi que l'endothéline et la thromboxane A2 (vasoconstrictrices). La sous-expression des récepteurs d'adhésion, nommés ICAM (*InterCellular Adhesion Molecules*), régule les propriétés anti-adhésives des cellules endothéliales. Le rôle anti-thrombotique de l'endothélium est, quant à lui, permis grâce à l'expression d'une glycoprotéine transmembranaire : la thrombomoduline, récepteur de la thrombine. La thrombine est l'enzyme principale de la coagulation car elle active les plaquettes et induit la formation de fibrine pour constituer un caillot sanguin ; cependant, lorsqu'elle se lie à la thrombomoduline, un rétrocontrôle négatif se met en place dont le rôle est de diminuer la synthèse de thrombine et donc la coagulation (25). L'endothélium possède également des récepteurs faisant passer les éléments de la circulation sanguine vers la matrice extracellulaire à travers les cellules endothéliales, phénomène appelé « transcytose ». Dans le cas des lipoprotéines du sang, ces récepteurs sont, entre autres, les LDLR (*LDL receptor*), les SR-B1 (*Scavenger Receptor B1*) et les ABCA1

(*ATP-Binding Cassette transporter A1*) (26). Au niveau métabolique, les cellules endothéliales reposent principalement sur la glycolyse, avec un flux 200 fois supérieur à celui de la voie OXPHOS, pour générer de l'ATP et sur le métabolisme de l'arginine, via l'enzyme eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*), pour synthétiser de l'oxyde nitrique (NO) nécessaire dans l'homéostasie vasculaire (27). Pour répondre aux différents stimuli sanguins, les cellules endothéliales vont libérer des molécules vasoconstrictrices (endothéline) ou vasodilatatrices (NO, prostacycline), des médiateurs pro- ou anti-inflammatoires, ainsi que des facteurs de croissance mais aussi réprimer ou induire la synthèse de leurs récepteurs (28). Finalement, l'endothélium, considéré lors de sa découverte seulement comme une barrière physique, possède également de nombreuses propriétés et fonctions, et est considéré par certains comme un nouvel organe. Les deux autres composantes de l'intima sont la membrane basale, composée de laminine, collagène et glycosaminoglycanes, et la LEI, constituée d'élastine afin d'assurer l'extensibilité des artères.

La **media** est formée du muscle lisse et de la limitante élastique externe (LEE). Le muscle lisse est composé de cellules musculaires lisses qui contrôlent le tonus artériel (équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation). La régulation de ce tonus artériel s'effectue par le système nerveux autonome (systèmes orthosympathique et parasympathique) et par le système hormonal (par exemple, le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone). Le système orthosympathique est responsable de la vasoconstriction via la fixation des catécholamines sur les récepteurs adrénergiques entraînant la vasoconstriction, tandis que les récepteurs muscariniques du système parasympathique fixent l'acétylcholine induisant une vasodilatation. Le système orthosympathique est le système en activité à pression artérielle normale. La dérégulation du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone peut aboutir à une synthèse trop importante d'angiotensine II, connue pour être un médiateur pro-inflammatoire et vasoconstricteur en faveur de la formation des plaques d'athérome (29). La LEE, moins épaisse que l'interne, a le même rôle et la même composition.

Entourant toutes ces cellules, la matrice extracellulaire (MEC), composée de collagène, protéoglycane, élastine et glycoprotéines, a pour rôle de les relier entre elles afin de former la structure de la paroi artérielle. La MEC est propre à chaque organe et de nombreuses interactions ont lieu entre les cellules et la MEC.

Enfin, l'**adventice** est la tunique externe qui recouvre toutes ces couches. Elle est composée de fibroblastes et de tissu conjonctif lâche riche en collagène, et permet d'accrocher les artères aux tissus environnants. Dans les grosses artères, on peut retrouver au niveau de leur adventice le *Vasa-vasorum* ; c'est une microcirculation qui permet d'oxygéner les cellules de la paroi trop éloignées de la lumière artérielle.

IV. A. 2) Les éléments sanguins

Le sang est composé d'un liquide – le plasma – dans lequel baignent les globules rouges ou hématies (chargés de l'apport en oxygène), les globules blancs ou leucocytes (cellules du système immunitaire) et les plaquettes (responsable de la coagulation) ainsi que de nombreuses protéines et molécules. Dans le contexte de l'athérosclérose, ce sont principalement les plaquettes, les leucocytes de type monocytes/macrophages et les protéines chargées du transport des lipides, nommées lipoprotéines, ainsi que des médiateurs (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, métalloprotéinases) qui participent au développement de cette maladie.

IV. A. 3) Les plaquettes

Les plaquettes sanguines, ou thrombocytes, sont de petites cellules anucléées (2µm de diamètre) différenciées à partir des mégacaryocytes issus de la moelle osseuse. Elles sont responsables de la coagulation sanguine ; lorsqu'on se blesse ou qu'un vaisseau éclate, les plaquettes arrivent en grand nombre et vont s'agglutiner au niveau de la brèche, l'obstruer et diminuer ainsi l'hémorragie. En moyenne, les plaquettes sont comprises entre 150 000 et 200 000 par mm^3 (30). Une baisse de plaquettes (thrombopénie) peut entrainer un risque d'hémorragie tandis qu'une augmentation du nombre de plaquettes (thrombocytose) peut provoquer des caillots sanguins. La thrombocytose peut être provoquée par une maladie infectieuse, une maladie inflammatoire chronique ou une anémie chronique en fer, et est un facteur de risque non négligeable dans de nombreuses pathologies, comme l'athérosclérose (31). Au-delà du rôle central des plaquettes dans la formation du thrombus, elles interviennent également dans la formation des plaques (32). Les plaquettes vont d'abord se lier à la P-sélectine des cellules endothéliales via GPIbα et PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) puis adhérer fortement via les intégrines de type β3 (telle que la glycoprotéine αIIbβ3). La liaison de CD40 avec son ligand (CD40L sur les plaquettes) va entrainer l'activation des plaquettes, lesquelles vont ensuite synthétiser des chimiokines responsables du recrutement des monocytes (PF4/CXCL4, RANTES/CCL5, CCL2/MCP-1 (*monocyte chemoattractant Protein-1*)) et de la rétention des lipoprotéines (PF4), ainsi que des cytokines inflammatoires (IL-1β) et des récepteurs d'adhésion (E-sélectine, VCAM-1, ICAM-1) (33). La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les plaquettes activées induit une lyse protéique via les métalloprotéinases (MMPs) fragilisant la chape fibreuse (34). Par la suite, lorsque la plaque se rompt, les plaquettes interviennent au niveau du thrombus. Lors de la rupture de la plaque, les protéines de la MEC sont exposées au flux sanguin recrutant ainsi les plaquettes. Ces dernières vont alors se fixer au domaine A1 du facteur de Willebrand (vWF) via leur récepteur GPIbα, ce qui va entrainer une modification conformationnelle de la glycoprotéine αIIbβ3 permettant la liaison de haute affinité avec le fibrinogène (35,36). Cette liaison de haute affinité au fibrinogène ainsi que le recrutement massif de plaquettes sont à l'origine du développement du caillot.

IV. A. 4) Les cellules immunitaires

Les cellules immunitaires se distinguent en deux groupes, celles de l'immunité innée (les granulocytes, les cellules NK (*Natural Killer*), les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques) et celles de l'immunité adaptative (les lymphocytes).

Les granulocytes

Les granulocytes (10-15µm de diamètre), comme leur nom l'indique, possèdent de nombreuses granulations qui permettent d'en distinguer, selon leurs propriétés, trois types : les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles. Les neutrophiles (50-70% des leucocytes) sont les premières cellules recrutées dans un tissu infecté car ils ont une fonction de phagocytose très développée grâce aux enzymes présentes dans leurs granules. Les basophiles sont, eux, impliqués dans les réactions allergiques via leurs granules riches en histamine et représentent moins de 1% des globules blancs. Enfin, les éosinophiles sont principalement impliqués dans la lutte antiparasitaire et constituent 1 à 3% des leucocytes. Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées au niveau des lésions athérosclérotiques lorsque les LDL oxydées (LDLox) commencent à s'accumuler. Ce sont eux qui sécrètent les premiers médiateurs inflammatoires. Ils développent également des mécanismes effecteurs qui leur sont spécifiques : les NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) qui vont activer l'endothélium (37–39).

Les monocytes/macrophages

Les monocytes sont de grosses cellules (15-30µm) issues de précurseurs dans la moelle osseuse et faisant partie du système immunitaire inné. Ils représentent 2 à 10 % des leucocytes. Ils migrent ensuite au niveau des tissus où ils se différencient en macrophages (20-60µm) ayant pour fonction la phagocytose (élimination) des débris, des intrus et des cellules mortes. Les macrophages interviennent également, pour une grande part, dans la présentation des antigènes (peptides issus de la dégradation des protéines endogènes ou exogènes par ces cellules) aux lymphocytes. Les monocytes/macrophages interviennent, eux, à toutes les étapes de l'athérogenèse (40–42), c'est pourquoi un chapitre entier leur est dédié.

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques font partie du système immunitaire inné. Elles jouent un rôle majeur dans le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative par leur action de présentation de l'antigène aux lymphocytes. Dans le cas de l'athérosclérose, elles sont très importantes car elles vont capturer les LDLox et activer les lymphocytes T et les NK maintenant la réponse inflammatoire. De plus, l'environnement inflammatoires peut induire la différenciation des monocytes en cellules dendritiques inflammatoires sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (37,43).

Les cellules NK

Les cellules NK (de 12 à 14µm) sont des lymphocytes de l'immunité innée spécialisés dans la lyse des cellules tumorales ou infectées. Le rôle des cellules NK dans le développement des plaques n'est pas encore complètement établi. Cependant des études ont montré qu'une forte interaction avec les cellules dendritiques existaient, permettant l'activation des NK et la maturation des cellules dendritiques. Les NK activés synthétisent des cytokines pro-inflammatoires telles, que l'IFN-γ participant ainsi au développement de l'inflammation, en faveur de la progression des plaques (44,45).

Les lymphocytes

Les lymphocytes représentent 20 à 40% des globules blancs. Les lymphocytes T et B sont des cellules du système immunitaire adaptatif et font moins de 10µm de diamètre au repos et jusqu'à 15µm une fois activés. Les lymphocytes T finissent leur maturation dans le thymus et on distingue les T helper, les T régulateurs (Treg) et les T cytotoxiques. Les deux premiers expriment le corécepteur CD4 et contrôlent la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes T cytotoxiques expriment le corécepteur CD8 et ont pour fonction d'éliminer les cellules infectées ou cancéreuses. Les lymphocytes B maturent dans la moelle osseuse et sont à l'origine des plasmocytes, responsables de la sécrétion des anticorps. La population lymphocytaire est majoritairement pro-athérogénique, particulièrement dans l'environnement pro-inflammatoire des plaques (46). Les lymphocytes T CD4+ sont pro-athérogéniques via la sécrétion d'IFN-γ. Les Treg sont anti-athérogéniques car ils diminuent l'inflammation via la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β, et limitent la prolifération des lymphocytes CD4+ et CD8+. Les lymphocytes CD8+ induisent la progression des plaques d'athérome via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ et TNF) et via l'induction de l'apoptose cellulaire. Leur proportion augmente en même temps que les plaques se développent. Les lymphocytes B induisent également une progression des plaques via l'induction d'une réponse Th1 (47).

IV. A. 5) Les lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des vésicules chargées du transport des lipides et du cholestérol dans la circulation sanguine. Elles sont constituées d'un cœur hydrophobe de triglycérides et d'esters de cholestérol en quantités variables, enveloppé d'une monocouche externe amphiphile composée de phospholipides, de cholestérol libre et d'une ou plusieurs apolipoprotéines (Apo) qui permettent la cohésion de la vésicule (Figure 2).

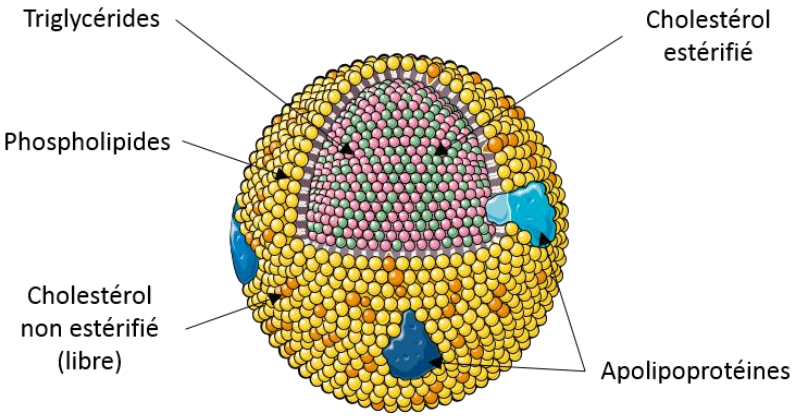


Figure 2 : Schéma général d'une lipoprotéine

Selon leur composition en lipides et protéines, les lipoprotéines n'ont pas la même densité : les lipoprotéines les plus denses étant les plus riches en protéines et les moins denses les plus riches en lipides. C'est de cette manière qu'on les nomme, de la moins dense à la plus dense : CM (chylomicrons), VLDL (*very-low-density lipoprotein*), IDL (*intermediate-density lipoprotein*), LDL (*low-density lipoprotein*) et HDL (*high-density lipoprotein*). Le tableau ci-dessous (Tableau 1) regroupe leurs caractéristiques (48).

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de lipoprotéines

	Densité (g/mL)	**Diamètre (nm)**	**% de protéines**	**% de cholestérol**	**% de triglycérides**	**Apolipo-protéines (Apo)**	**Fonction**
CM	<0,95	>100	2	4-8	**84-88**	ApoA-IV, ApoB-48, ApoE	Intestin -> Foie
VLDL	0,95-1,006	30 – 80	7-10	20-25	**50-55**	ApoB-100, ApoE	Foie -> toutes les cellules de l'organisme
IDL	1,006-1,019	25 – 50	10-18	**29-45**	25-31	ApoB-100, ApoE	
LDL	1,019-1,063	18-28	20-25	**45-58**	10-15	ApoB-100, ApoE	
HDL	>1,063	5-15	**33-57**	17-40	3-15	ApoA-I, ApoD, ApoE	Tissus -> Foie

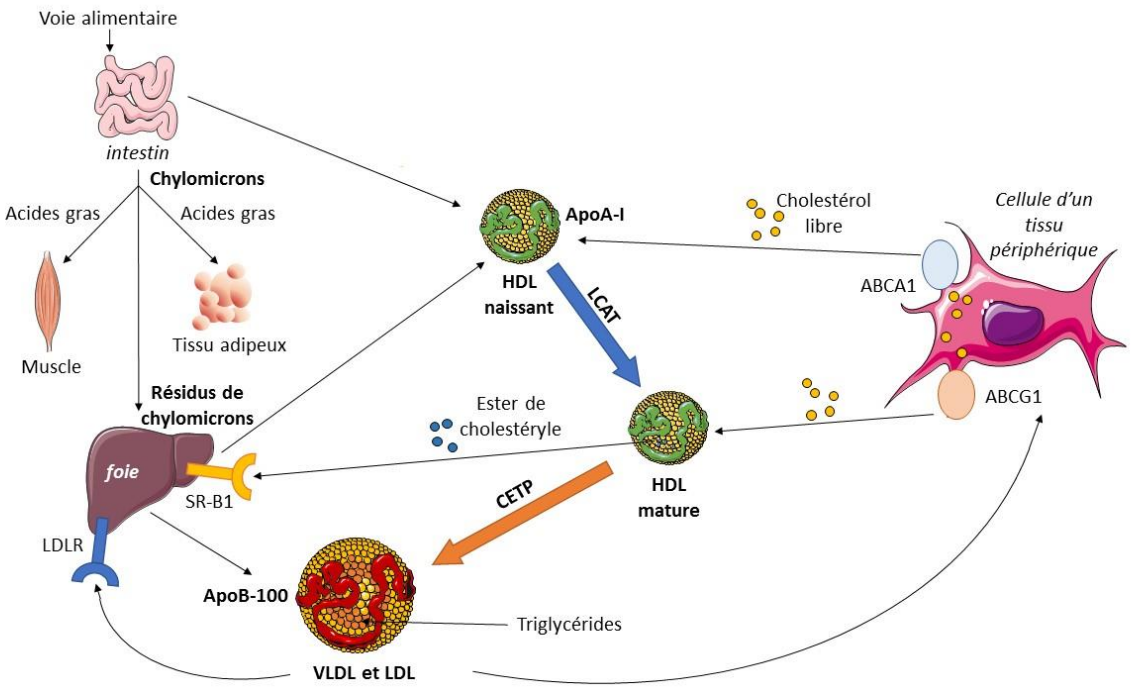


Figure 3 : Schéma du transport des lipides par les lipoprotéines (Inspirée de : Rader et Daugherty, 2008)

Le métabolisme des lipoprotéines, schématisé ci-dessus par la Figure 3, implique le transport de lipides, cholestérol et triglycérides dans le sang afin d'alimenter les organes et d'éliminer le surplus. L'intestin digère les graisses issues de l'alimentation et les stocke dans des chylomicrons (grandes lipoprotéines riches en triglycérides) permettant ainsi leur acheminement vers les tissus périphériques, tels que les tissus adipeux et musculaires, utilisant majoritairement les acides gras libres comme nutriments. Afin de récupérer les triglycérides des chylomicrons, les cellules adipeuses et musculaires synthétisent et sécrètent une enzyme nommée lipoprotéine lipase (LPL). Celle-ci se fixe sur les cellules endothéliales des capillaires irriguant ces tissus, et hydrolyse les triglycérides des chylomicrons circulants. Les acides gras libérés sont alors captés par la sérumalbumine et transportés jusqu'aux cellules des tissus adipeux et musculaires. Les résidus de chylomicrons sont ensuite absorbés par le foie via la liaison de l'ApoE sur le récepteur hépatique aux résidus de chylomicrons. Le foie va charger les lipides sur l'ApoB-100 et ainsi sécréter des lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Ces VLDL ont également pour rôle d'apporter les triglycérides aux tissus, via la LPL, de manière similaire aux chylomicrons. Les résidus de VLDL qui en découlent sont en fait des lipoprotéines de densité faible (LDL) ou intermédiaire (IDL) qui sont réabsorbées par le foie via le récepteur aux LDL (LDLR). Les LDL servent également à apporter du cholestérol aux tissus périphériques via l'interaction de l'ApoB-100 et du LDLR. Les LDL sont internalisées par les cellules et hydrolysées dans les lysosomes. Les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont synthétisées par l'intestin et par le foie et ont pour rôle de récupérer le cholestérol libre des cellules des organes périphériques, et également des macrophages,

cette fonction s'appelle l'efflux de cholestérol ou transport inverse du cholestérol. Pour les HDL naissants, c'est l'Apo-A1 qui, en se liant au transporteur ABCA1 (*ATP-cassette subfamily A1*), récupère le cholestérol libre des cellules. Après estérification du cholestérol par l'enzyme lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT), les HDL deviennent matures. Ces lipides peuvent toujours réaliser l'efflux du cholestérol, mais dans ce cas l'Apo-A1 récupère le cholestérol via le transporteur ABCG1 (*ATP-cassette subfamily G1*). La transcription des gènes codant pour les transporteurs ABCA1 et ABCG1 est contrôlée par les récepteurs nucléaires LXR (*Liver X Receptor*) activés par les formes oxydées du cholestérol. Les HDL matures chargées en cholestérol sont prises en charge par le foie, soit directement via les récepteurs SR-B1, soit indirectement via le LDLR après avoir été transformées en LDL par la protéine de transfert d'esters de cholestérol (CETP) (49). A noter que ce qui est communément appelé « bon » cholestérol correspond au cholestérol en voie de dégradation, c'est-à-dire transporté par les HDL, tandis que le « mauvais » cholestérol correspond à celui transporté par les LDL à destination des cellules.

Les **apolipoprotéines A** (ApoA). L'ApoA-I est l'apolipoprotéine majoritaire des HDL et intervient dans le transport reverse du cholestérol en acceptant le cholestérol libre des membranes cellulaires via l'interaction avec le transporteur ABCA1 (50). L'ApoA-I est également le cofacteur de l'enzyme LCAT qui permet l'estérification du cholestérol libre et donc la maturation des HDL (48). L'ApoA-IV est la principale apolipoprotéine A synthétisée après ingestion d'acides gras à longue chaine. Elle est majoritairement retrouvée dans les chylomicrons et joue un rôle dans le métabolisme des triglycérides. L'ApoA-IV intervient également dans le transport reverse du cholestérol, dans l'agrégation plaquettaire, dans l'homéostasie glycolytique et il a été montré qu'une grande quantité de cette lipoprotéine confère une protection contre l'athérosclérose (51).

L'**apolipoprotéine B** (ApoB). L'ApoB-48 permet la formation des chylomicrons dans les entérocytes intestinaux tandis que l'ApoB-100 est utilisée pour l'assemblage des VLDL dans les hépatocytes (50). L'ApoB-100 permet également la liaison entre les LDL et leur récepteur (LDLR).

L'**apolipoprotéine E** (ApoE) est un ligand du LDLR. Synthétisée par le foie, elle est responsable du catabolisme naturel des lipoprotéines riches en triglycérides (VLDL et LDL). Elle est également produite par les astrocytes pour transporter le cholestérol aux neurones.

De nombreuses études ont montré que les lipoprotéines contenant l'ApoB (les LDL) sont fortement reliées au développement des plaques d'athérome (52). A l'heure actuelle, la stratégie médicamenteuse consiste donc à faire diminuer le taux de LDL sanguin via l'utilisation des statines. Ces molécules ont pour effet d'inhiber la synthèse de cholestérol et ainsi d'accélérer l'élimination des LDL par le foie (49).

IV. A. 6) Les enzymes et médiateurs

L'hydrolyse des constituants de la matrice extracellulaire (MEC) de la paroi artérielle peut intervenir autant dans des processus physiologiques (morphogenèse, cicatrisation) que pathologiques (hypertension, athérosclérose, cancer), et est réalisée pas des **métalloprotéinases** (MMPs). La famille des MMPs possède une structure commune dont le domaine catalytique possède du zinc. Cette famille comprend 23 membres exprimés chez les humains dont 14 dans la paroi vasculaire (53). Pour les différencier, ces MMPs ont été classées en fonction de leur substrat : les collagénases (MMP-1, MMP-8 et MMP-13), les gélatinases (MMP-2 et MMP-9), les stromelysines ou protéoglycannases (MMP-3, MMP-10 et MMP-11), les matrilysines ou élastases (MMP-7 et MMP-12), les MMPs transmembranaires (MT-MMP 1 à 6) et les autres. Les cellules endothéliales expriment les MMP-1, 2, 3, 7, 9, les macrophages les MMP-1, 8, 9, 13 et les cellules musculaires lisses les MMP-1, 2, 3, 7, 9, 12, 13, 14 (54). Les MMPs sont synthétisées sous forme inactive et nécessite un clivage, généralement par d'autres MMPs, pour être activées. L'expression et l'activité des MMPs peuvent aussi être régulées par de nombreuses protéines, cytokines et chimiokines. Par exemple, les facteurs de croissance de l'endothélium (VEGF) et épidermal (EGF) ainsi que les cytokines pro-inflammatoires vont augmenter l'expression des MMPs. Outre leur rôle dans la dégradation de la MEC, les MMPs interviennent également dans la prolifération et la migration des CML (55). Dans le cadre de l'athérosclérose, il a été montré que les MMPs-1, 2, 3, 8 et 9 sont impliquées dans la progression des plaques (56).

Les **cytokines**, **chimiokines** et **facteurs de croissance** jouent un rôle important dans l'athérosclérose en tant que médiateurs (57). Ils peuvent avoir une action pro- ou anti-inflammatoire, promouvoir le remodelage de la paroi artérielle et recruter les leucocytes. Les chimiokines sont un sous-groupe de cytokines capables de recruter les cellules à un endroit voulu. Les chimiokines majoritaires dans le développement de l'athérosclérose sont les chimiokines CCL2 (*CC-chemokine ligand 2*), CCL5 (*CC-chemokine ligand 5)* et CX3CL1 (*C-X3-C motif ligand 1*). CCL2, aussi appelée MCP-1 (*monocyte chemoattractant Protein-1*), est la chimiokine majeure dans le recrutement des monocytes. CX3CL1 et CCL5 sont deux chimiokines clés dans l'étape de « rolling » des monocytes circulants en permettant à ces derniers de se fixer sur les récepteurs endothéliaux aux monocytes (VCAM-1, ICAM-1) (Figure 4).

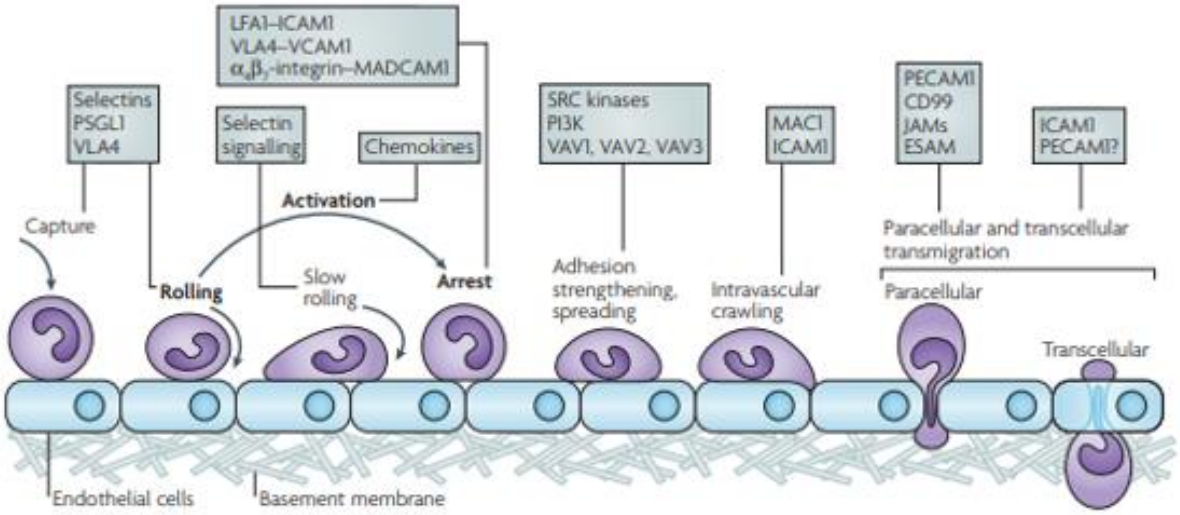


Figure 4 : Etapes dans l'arrêt et la transmigration des macrophages à travers l'endothélium. Ley, et al. Nat Rev Immunol. 2007. Les trois étapes originales sont indiquées en gras : le roulement (rolling), médié par les sélectines, l'activation, médiée par les chimiokines, et l'arrêt, médié par les intégrines. Les molécules clés impliquées dans chaque étape sont indiquées dans les encadrés. ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule) ; ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1) ; JAM (junctional adhesion molecule) ; LFA1 (lymphocyte function-associated antigen 1) également appelé αL β2-integrin ; MAC1 (macrophage antigen 1) ; MADCAM1 (mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1) ; PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) ; PECAM1 (platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1) ; PI3K (phosphoinositide 3-kinase) ; VCAM1 (vascular cell-adhesion molecule 1) ; VLA4 (very late antigen 4) également appelé α4 β1-intégrine.

Les facteurs de croissance et cytokines jouent ensuite un rôle majeur sur les monocytes/macrophages. Tout d'abord, le M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) induit la différenciation des monocytes en macrophages. Les macrophages acquièrent ensuite un phénotype pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire en fonction des cytokines présentes dans le microenvironnement. Les macrophages pro-inflammatoires sont induits par le LPS et les cytokines pro-inflammatoires IFN-γ et IL-1β, et sécrètent de l'IL-6, IL-12 et du TNF-α, tandis que les macrophages anti-inflammatoires sont activés par les cytokines immuno-régulatrices IL-4 et IL-13 et produisent de l'IL-10 et du TGF-β.

IV. A. 7) Le fer

L'accumulation de fer dans les macrophages participe également à la déstabilisation et à la progression des plaques d'athérome. L'hepcidine est le régulateur principal de l'homéostasie du fer. Il intervient en diminuant le transporteur impliqué dans l'export du fer (ferroportine) induisant ainsi une accumulation dans les cellules. Le fer en grande quantité favorise la production de ROS provoquant des dommages protéiques et lipidiques responsables de la mort cellulaire (58). Dans les plaques d'athérome hémorragiques, les macrophages phagocytent, en plus des lipides, du fer qui induit un profil de type pro-inflammatoire voire spumeux en inhibant l'export du cholestérol (59).

IV. B. Initiation des lésions

IV. B. 1) Forces de cisaillement, accumulation de LDL et stress oxydant

Le processus athéromateux débute dès l'enfance au niveau des artères de gros et moyen calibre, telles que l'aorte, les artères cérébrales, les artères coronaires, les artères iliaques et rénales. C'est dans les zones de bifurcation ou de courbures aigues que la circulation sanguine va être perturbée ; le flux sanguin n'est plus stable et linéaire mais irrégulier et turbulent. Il en résulte des forces de cisaillement perturbées (58) qui vont modifier fortement la morphologie, le phénotype et le métabolisme des cellules endothéliales, les faisant passer d'un état dans lequel elles sont étirées dans le sens du flux et anti-inflammatoire/anti-thrombotique avec un faible taux prolifératif à une forme pavimenteuse, non alignées et pro-inflammatoire, avec un fort taux de prolifération (59,60). Tout d'abord, les cellules endothéliales vont détecter les forces de cisaillement du flux sanguin grâce à leurs mécanorécepteurs. Les mécanismes leur permettant de distinguer ces deux types de flux sont mal connus, mais la mécano-transduction serait liée à des structures présentes au pôle apical, telles que les cils primaires, le glycocalyx, les intégrines, les canaux ioniques, les protéines G hétérotrimériques, les récepteurs à activité tyrosine kinase et la NADPH oxydase (61). La Figure 5 regroupe les voies de signalisation et les fonctions induites par les deux types de flux : linéaire (Figure 5A) et turbulent (Figure 5B).

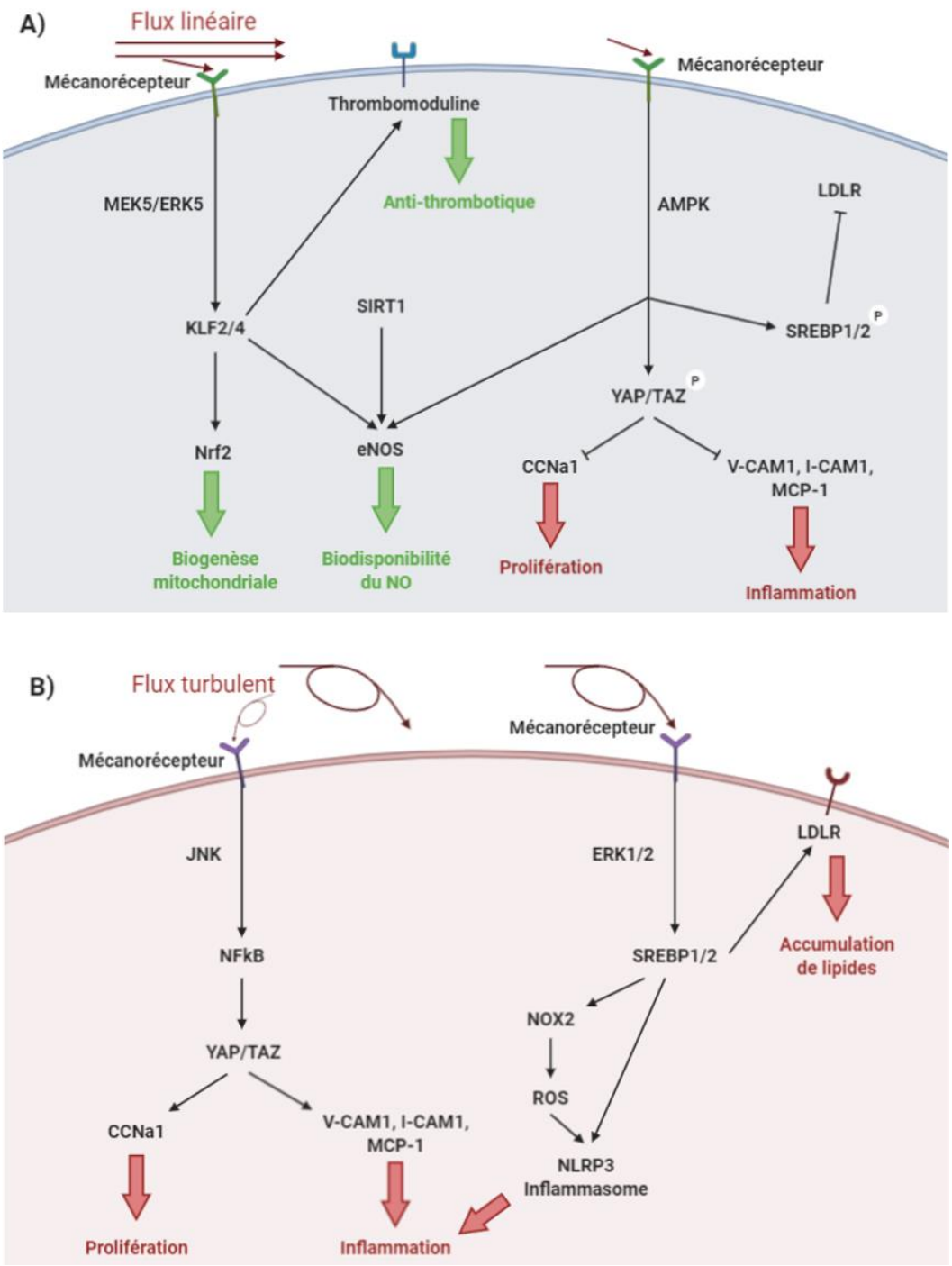


Figure 5 : Réponse cellulaire au type de flux sanguin. Créée avec BioRender.com.

Dans le cas d'un flux sanguin linéaire, la voie de signalisation des kinases MEK5/ERK5 est activée et induit l'expression des facteurs de type Kruppel-like 2 et 4 (KLF2 et KLF4) ; KLF2, en promouvant l'activation du facteur Nrf2, permet la mise en place du phénotype quiescent des cellules endothéliales (62,63). La surexpression de KLF2 induit l'expression de la thrombomoduline (anti-thrombotique) et de l'enzyme eNOS qui permet la synthèse de NO, responsable de la vasodilatation et de la suppression de l'inflammation (64). Le flux sanguin linéaire active aussi la voie de l'AMPK qui va également activer

l'eNOS, mais aussi inhiber YAP/TAZ en les phosphorylant ce qui inhibe la synthèse des facteurs CCNa1, responsable de la prolifération cellulaire, et des molécules d'adhésion V-CAM1, I-CAM1 et MCP-1 (CCL2), responsable de l'adhésion des leucocytes et donc de l'inflammation (65). L'AMPK va également inhiber les facteurs SREBP (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2*), inhibant ainsi la synthèse de récepteurs aux LDL (LDLR). En revanche, lorsque le flux devient turbulent, c'est le facteur NF-κB qui est activé (66), à la place de KLF2, via la voie des JNK. La voie de l'AMPK n'est pas activée, il n'y aura donc pas de phosphorylation du complexe YAP/TAZ qui va pouvoir activer la synthèse des facteurs CCNa1, responsable de la prolifération cellulaire, et des molécules d'adhésion V-CAM1, I-CAM1 et MCP-1 (CCL2), responsable de l'adhésion des leucocytes et donc de l'inflammation. Le flux turbulent va également activer la voie des kinases ERK 1 et 2 induisant la synthèse des facteurs de type SREBP responsables de nombreux effets, comme la production de ROS via l'activation de l'isoforme 2 de la NADPH oxydase (NOX2) (67), ou la régulation du métabolisme des lipides en induisant l'expression du LDLR ainsi que la synthèse de lipides (68). L'expression de NOX2 est également fortement augmentée avec l'âge (67) favorisant un phénotype inflammatoire. Cette inflammation, associée à une forte concentration de LDLR ainsi qu'à la forme pavimenteuse des cellules qui sont donc non jointives, provoque une augmentation de la perméabilité endothéliale facilitant ainsi la pénétration des LDL. Ces LDL vont être oxydées par le stress oxydant environnant. Lors de cette oxydation, les phospholipides de surface des LDL peuvent être peroxydés pour former des dérivés oxydés proches structuralement des PAF (*Platelet activating factor*) pouvant de ce fait avoir des propriétés inflammatoires et immunogènes (69) ; les LDLox vont donc activer les plaquettes induisant ainsi la chaîne de coagulation.

IV. B. 2) Recrutement des cellules immunitaires et élimination des LDL oxydées

Le recrutement des cellules immunitaires est activé à la fois par le flux sanguin irrégulier et par l'oxydation des LDL. Le flux turbulent va augmenter l'expression, dans les cellules endothéliales, de nombreuses molécules d'adhérence (CAM) et chimiokines (MCP-1/CCL2, CX3CL1) qui vont recruter les monocytes. La chimiokine CX3CL1 existe sous deux formes : la forme sécrétée, qui induit le recrutement des monocytes, et la forme transmembranaire permettant l'attachement des monocytes sanguins à la surface de l'endothélium (70). Les monocytes vont adhérer à la paroi endothéliale également grâce aux sélectines P et E et à V-CAM1, la traverser grâce à I-CAM1 (71) et se différencier en macrophages dans l'intima grâce au facteur de croissance M-CSF (produit par les cellules endothéliales inflammatoires) (72).

Les récepteurs aux LDL sont très sensibles ; au moindre changement biochimique des LDL (oxydation, glycation, dégradations liées à la fumée de cigarette ou à d'autres facteurs comme le sucre), celles-ci ne sont plus reconnues par leurs récepteurs (LDLR) mais par des récepteurs scavenger (« éboueurs »)

ayant pour rôle d'éliminer ces lipides modifiés. Ces récepteurs scavenger sont majoritairement présents sur les macrophages, et il en existe de nombreux types tels que SR-A (*Scavenger Receptor-A*), SR-B (*Scavenger Receptor-B*) et SR-EC1 (*Scavenger Receptor-EC1*), MARCO (*MAcrophage Receptor with COllagenase structure*), CD36 et LOX1 (*Lectin-type OXidized LDL receptor 1*) (73). Lors de la liaison des LDLox sur ces récepteurs, les macrophages vont être activés et exprimer davantage de récepteurs scavenger afin d'éliminer le maximum de LDLox (74), et davantage de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1, IL-6 et IFN-γ) qui alimentent l'inflammation (75).

IV. B. 3) Progression des lésions et formation de la plaque

IV. B. 3) a) Formation du cœur nécrotique

Face à l'afflux de LDLox, les macrophages ne vont plus réussir à les éliminer correctement, ils vont accumuler ces lipides dégradés et devenir « spumeux ». Ces macrophages spumeux perdent leur capacité à réaliser l'efferocytose (l'élimination des cellules apoptotiques) (73) et finissent par entrer en apoptose. Il va donc y avoir une accumulation de macrophages spumeux incapables d'éliminer les cellules apoptotiques et ces dernières vont se nécroser aboutissant à la formation d'un cœur nécrotique (76).

IV. B. 3) b) Réorganisation de la paroi artérielle

Dans ce contexte hyper-inflammatoire et riche en plaquettes activées, les cellules musculaires lisses passent d'un phénotype « contractile » à un phénotype « sécrétant ». Elles peuvent aussi devenir spumeuses (77) et migrer vers les cellules endothéliales (78) où elles sécrètent des facteurs de croissance induisant la synthèse de collagène et de protéoglycanes ainsi que de nombreuses cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α), chimiokines (M-CP1 (CCL2)) et molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) inflammatoires (79). L'ensemble constitué de ces cellules musculaires, du collagène et des protéoglycanes forme ce qu'on appelle la chape fibreuse (entre le cœur nécrotique et les cellules endothéliales) contenant le cœur nécrotique.

Les étapes de l'athérogenèse qui viennent d'être expliquées sont représentées dans la Figure 6 :

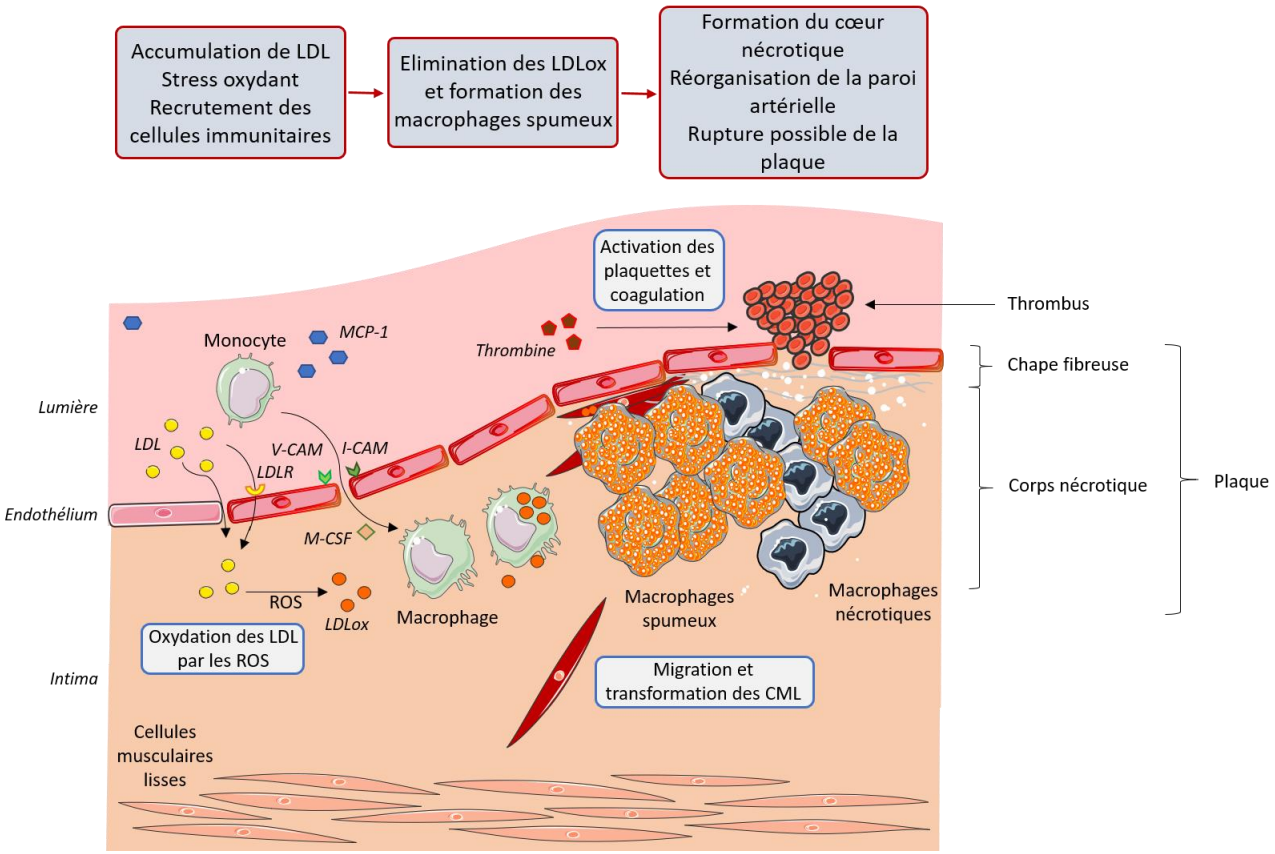


Figure 6 : Schéma général de la formation et de la rupture d'une plaque

IV. B. 4) Evolution de la plaque

Une plaque d'athérosclérose évolue lentement, sur plusieurs années, et son évolution peut aboutir à différents types de plaques. Lorsqu'elles se développent, les plaques peuvent soit obstruer la lumière artérielle, elles sont alors appelées « sténosantes », soit grossir à l'intérieur de la paroi vasculaires, dans ce cas elles sont non sténosantes. Par ailleurs, les plaques peuvent évoluer différemment selon leur composition. Un cœur nécrotique volumineux, une chape fibreuse fine et un nombre important de macrophages définissent les plaques « à risque (de rupture) » tandis que celles qui présentent un cœur nécrotique plus ou moins volumineux associé à une chape fibreuse épaisse sont appelées « plaques stables » (80). Cependant, ces dernières peuvent à tout moment évoluer et devenir également des plaques instables c'est-à-dire à risque. La rupture de la chape fibreuse contenant le cœur lipidique nécrotique entraine la formation d'un caillot sanguin car, dans cet environnement hyper-inflammatoire, les cellules endothéliales sous-expriment le thrombomoduline à leur surface ; la thrombine libre s'accumule et active la coagulation. Sous la pression du flux sanguin, ce caillot peut se détacher, partir dans la circulation et bloquer les artères plus petites provoquant des infarctus ou des AVC.

Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer pourquoi la chape fibreuse est amenée à se rompre. Les LDLox activeraient la voie des kinases ERK1/2 induisant la synthèse des MMP-1 responsables de la dégradation de la MEC, dégradation connue pour être en lien avec la rupture de la chape fibreuse (81). La vulnérabilité a également été associée à un faible degré de calcification des plaques, suggérant que la calcification jouerait un rôle stabilisateur (82). Ce concept a été approfondi par la découverte de deux types de calcification : les micro-calcifications, associées à un risque de rupture accru, et les macro-calcifications, favorisant la stabilité de la plaque (83).

V. Outils diagnostiques et méthodes thérapeutiques

De nombreux facteurs prédictifs de la rupture sont identifiés, tels que l'inflammation, la présence de métalloprotéinases, l'activation de la coagulation, la morphologie (gros cœur nécrotique et une chape fibreuse fine), et les microcalcifications. Cependant, à l'heure actuelle, les technologies ne permettent pas de détecter ces facteurs en routine. Les méthodes de diagnostic reposent essentiellement sur des données hémodynamiques qui ne révèlent en rien le risque de rupture.

V. A. Diagnostics actuels

Le diagnostic de l'athérosclérose est effectué après l'apparition des premiers symptômes caractéristiques tels qu'un essoufflement à l'effort ou une douleur thoracique. Un interrogatoire du patient est alors mené afin de déterminer le nombre de facteurs de risque qui pourraient être à l'origine de ces symptômes : son mode de vie (alimentation, activité physique, état de stress, sommeil, tabagisme et consommation d'alcool) ainsi que les antécédents familiaux sont passés au crible. A la suite de cet entretien, des examens cliniques et biologiques seront effectués afin de mesurer sa tension, son poids, et de doser ses taux de sucre et de cholestérol sanguin. En fonction de tous ces résultats, une imagerie des artères pourra être envisagée. Les méthodes d'imagerie actuelle sont l'échographie Doppler et l'angiographie. L'échographie Doppler est un examen non invasif généralement indiqué en première intention. Il permet de visualiser les structures vasculaires et de quantifier les vitesses circulatoires. Cependant, il peut être nécessaire d'effectuer des examens plus approfondis. Dans ces cas, une angiographie est prescrite. L'angiographie est un examen invasif nécessitant l'injection d'un produit de contraste. Ce produit de contraste permet de rendre visible les vaisseaux que l'on ne voit pas avec l'échographie Doppler. L'observation est réalisée par imagerie à rayon X. Ces techniques permettent de mettre en évidence le caractère sténosant d'une plaque. Le

pourcentage de réduction de la lumière artérielle est ainsi détecté et mesuré afin de déterminer si une opération chirurgicale doit être envisagée :

- Si le pourcentage est supérieur à 70% de réduction, l'élimination de la plaque ou la pose d'un stent est proposée au patient.
- Si le pourcentage est inférieur à 70%, seule une surveillance accrue est mise en place ainsi qu'un traitement médicamenteux (généralement des statines, inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase régulant la voie des LDL, ce qui permet de faire baisser la cholestérolémie).

V. A. 1) Traitements chirurgicaux

Dans le cas où une opération chirurgicale a été programmée, le choix de la méthode va se faire dans l'objectif de réaliser une revascularisation la plus durable possible en minimisant le risque dû à l'opération en elle-même. Plusieurs techniques de revascularisation existent : la pose d'un stent, un pontage, le retrait de la plaque.

V. A. 1) a) Pose d'un stent

Un stent est un dispositif de forme tubulaire formé de mailles. Il est positionné à l'intérieur des artères pour maintenir l'artère ouverte et permettre au sang de circuler. La procédure de mise en place du stent se nomme angioplastie. Elle est réalisée sous anesthésie locale et consiste à insérer un ballon, autour duquel est posé le stent, dans l'artère. Le guidage est réalisé grâce à l'injection d'un produit de contraste. Une fois à l'endroit de la plaque, le ballon est gonflé pour augmenter le diamètre du stent et donc l'artère, puis est retiré, laissant le stent dilaté en place (Figure 7).

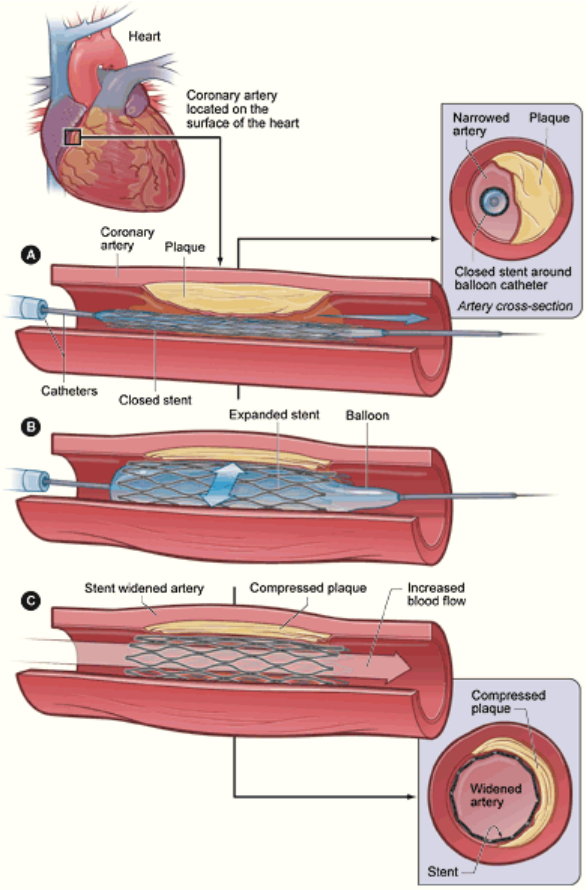


Figure 7 : Pose d'un stent. Issu du site NIH.org

Cette technique présente cependant quelques désavantages. Le stent reste un élément étranger, il faut donc donner un traitement au patient pour éviter la formation d'un caillot au niveau du stent. Il peut également arriver des cas de resténose de l'artère, soit immédiatement après la pose à cause du retour de l'élasticité de l'artère, ou plus tardivement lorsque la plaque se développe.

V. A. 1) b) Pontage

Le pontage est une technique chirurgicale consistant à contourner la zone sclérosée en mettant en place une circulation alternative (le « pont »). Le pont est constitué soit d'une artère ou d'une veine (retournée) du patient, soit d'un tube synthétique dans le cas des grosses artères (artères fémorales et iliaques).

V. A. 1) c) Retrait de la plaque ou endartériectomie

Le retrait chirurgical de la plaque se fait sous anesthésie générale. Après incision et repérage de la plaque, l'artère est clampée de part et d'autre de la plaque. Des entailles sont effectuées de part et d'autre de la plaque permettant de la retirer. L'artère est ensuite recousue grâce à un patch anti-coagulant (Figure 8).

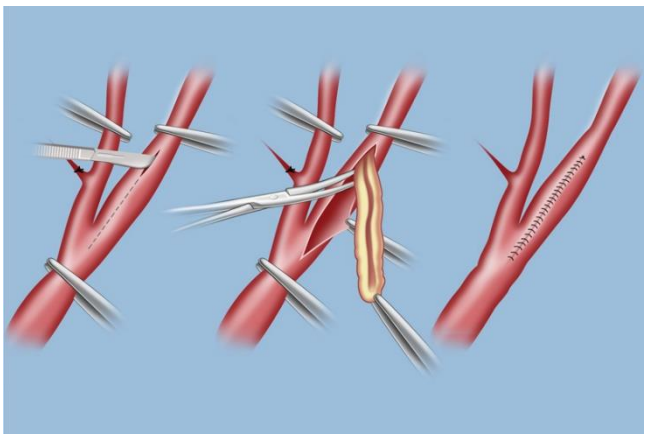


Figure 8 : Etapes de retrait chirurgical d'une plaque d'athérome par endartériectomie. Issu du site weillcornellbraineandspine.org

La méthode dépend de l'artère à opérer et/ou du nombre de rétrécissements observés (Tableau 2). En général, la pose d'un stent est réalisée lorsqu'un seul rétrécissement vasculaire est observé, et est préférée pour les artères coronaires. Si plusieurs rétrécissements sont observés dans le cas des artères coronaires, un pontage sera plutôt envisagé. En revanche, si plusieurs rétrécissements sur plusieurs artères sont détectés et/ou si un accident a déjà eu lieu, le retrait chirurgical des plaques sera privilégié pour les artères carotides (84).

Tableau 2 : Technique chirurgicale employée en fonction de l'artère à traiter

	PETITES ARTERES (ARTERES CORONAIRES)	**GROSSES ARTERES (ARTERES CAROTIDES)**
UN SEUL RETRECISSEMENT	stent	stent
PLUSIEURS RETRECISSEMENTS	pontage	Endartériectomie

Ces interventions chirurgicales sont accompagnées d'un traitement médicamenteux s'il n'y en a pas déjà un, afin de diminuer au maximum le risque de rechute.

VI. Objectifs thérapeutiques

La pertinence des méthodes d'imagerie conventionnelles pose aujourd'hui question. En effet, certains infarctus du myocarde sont liés à des plaques dont la sténose est modérée voire légère (85). Il peut donc y avoir des accidents vasculaires dus à des plaques non sténosantes à risque de rupture qui n'ont pas été détectées par l'imagerie de diagnostic actuelle. L'idéal serait une imagerie permettant de repérer, en parallèle de la sténose, les critères caractéristiques du risque de rupture des plaques, tels que le large cœur nécrotique, l'inflammation, la fine chape fibreuse ainsi que les micro-calcifications et le type de macrophages (qui sera décrit dans le paragraphe suivant). L'objectif des recherches actuelles concernant l'athérosclérose est de mieux comprendre le développement et l'évolution des plaques afin de déterminer des marqueurs réellement prédictifs de leur rupture. Cela permettra de mettre au point des techniques de diagnostic et de thérapie ciblant spécifiquement ces facteurs de risque de rupture. A l'heure actuelle, les principaux médicaments utilisés sont les statines qui ont pour rôle de faire diminuer la quantité de LDL. Cependant ce traitement n'est pas suffisant car il ne traite pas l'inflammation. Or, ce sont principalement les macrophages qui déclenchent cette inflammation et qui la soutiennent tout au long de l'athérogenèse. L'étude de ces cellules au sein des plaques apparait donc comme une voie majeure pour l'étude de la vulnérabilité des plaques.

Références :

1. Thompson RC, Allam AH, Lombardi GP, Wann LS, Sutherland ML, Sutherland JD, et al. Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations. Lancet Lond Engl. 2013 Apr 6;381(9873):1211–22.

2. Boon B. Leonardo da Vinci on atherosclerosis and the function of the sinuses of Valsalva. Neth Heart J. 2009 Dec;17(12):496–9.

3. Blankenhorn DH, Kramsch DM. Reversal of atherosis and sclerosis. The two components of atherosclerosis. Circulation. 1989 Jan;79(1):1–7.

4. Lesions WSG on the C of A, Organization WH. Classification des lésions d' athérosclérose : rapport d' un groupe d' étude [réuni à Washington du 7 au 11 octobre 1957] [Internet]. Genève : Organisation mondiale de la Santé; 1958 [cited 2020 Mar 16]. Available from: https://apps.who.int/iris/handle/10665/37030

5. WHO | Disease burden and mortality estimates [Internet]. WHO. [cited 2020 Feb 22]. Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/

6. CVD Statistics 2017 [Internet]. [cited 2020 Mar 26]. Available from: http://www.ehnheart.org/cvd-statistics/cvd-statistics-2017.html

7. Holman RL, McGill HC, Strong JP, Geer JC. The Natural History of Atherosclerosis. Am J Pathol. 1958 Apr;34(2):209–35.

8. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. N Engl J Med. 1998 Jun 4;338(23):1650–6.

9. Wahezi DM, Liebling EJ, Choi J, Dionizovik-Dimanovski M, Gao Q, Parekh J. Assessment of traditional and non-traditional risk factors for premature atherosclerosis in children with juvenile dermatomyositis and pediatric controls. Pediatr Rheumatol Online J. 2020 Mar 18;18.

10. WHO | WHO global report: mortality attributable to tobacco [Internet]. [cited 2020 Mar 19]. Available from: https://www.who.int/tobacco/publications/surveillance/rep_mortality_attributable/en/

11. Inserm_EC_2019_ActivitéPhysiqueMaladiesChroniques_Complet.pdf.

12. Schönbauer R, Lichtenauer M, Paar V, Emich M, Fritzer-Szekeres M, Schukro C, et al. Regular Training Increases sTWEAK and Its Decoy Receptor sCD163-Does Training Trigger the sTWEAK/sCD163-Axis to Induce an Anti-Inflammatory Effect? J Clin Med. 2020 Jun 17;9(6).

13. Dubreuil E. Alimentation et athérosclérose. :175.

14. Saini RK, Keum Y-S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance - A review. Life Sci. 2018 Jun 15;203:255–67.

15. Umemoto N, Ishii H, Kamoi D, Aoyama T, Sakakibara T, Takahashi H, et al. Reverse association of omega-3/omega-6 polyunsaturated fatty acids ratios with carotid atherosclerosis in patients on hemodialysis. Atherosclerosis. 2016;249:65–9.

16. Simopoulos AP. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. Asia Pac J Clin Nutr. 2008;17 Suppl 1:131–4.

17. McAlpine CS, Kiss MG, Rattik S, He S, Vassalli A, Valet C, et al. Sleep modulates hematopoiesis and protects against atherosclerosis. Nature. 2019 Feb;566(7744):383–7.

18. Domínguez F, Fuster V, Fernández-Alvira JM, Fernández-Friera L, López-Melgar B, Blanco-Rojo R, et al. Association of Sleep Duration and Quality With Subclinical Atherosclerosis. J Am Coll Cardiol. 2019 22;73(2):134–44.

19. Yvan-Charvet L, Merlin J. Le sommeil protège-t-il nos vaisseaux sanguins ? médecine/sciences. 2019 Oct 1;35(10):743–6.

20. Stanek A, Fazeli B, Bartuś S, Sutkowska E. The Role of Endothelium in Physiological and Pathological States: New Data. BioMed Res Int [Internet]. 2018 Nov 18 [cited 2020 Mar 26];2018. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6276514/

21. Korn C, Augustin HG. Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. Dev Cell. 2015 Jul 6;34(1):5–17.

22. Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, Anisimov A, Aplin AC, Auerbach R, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. Angiogenesis. 2018 Aug;21(3):425–532.

23. Wong BW, Marsch E, Treps L, Baes M, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism in health and disease: impact of hypoxia. EMBO J. 2017 Aug 1;36(15):2187–203.

24. Lehoux S, Tedgui A. Bases cellulaires de la mécanotransduction dans la cellule endothéliale. médecine/sciences. 2004 May 1;20(5):551–6.

25. Posma JJN, Posthuma JJ, Spronk HMH. Coagulation and non-coagulation effects of thrombin. J Thromb Haemost. 2016;14(10):1908–16.

26. Zhang X, Sessa WC, Fernández-Hernando C. Endothelial Transcytosis of Lipoproteins in Atherosclerosis. Front Cardiovasc Med. 2018 Sep 25;5.

27. Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. Circ Res. 2015 Mar 27;116(7):1231–44.

28. Li M, van Esch BCAM, Wagenaar GTM, Garssen J, Folkerts G, Henricks PAJ. Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. Eur J Pharmacol. 2018 Jul 15;831:52–9.

29. Carbone ML, Chadeuf G, Heurtebise-Chrétien S, Prieur X, Quillard T, Goueffic Y, et al. Leukocyte RhoA exchange factor Arhgef1 mediates vascular inflammation and atherosclerosis. J Clin Invest. 2017 01;127(12):4516–26.

30. Molnar MZ, Streja E, Kovesdy CP, Budoff MJ, Nissenson AR, Krishnan M, et al. High platelet count as a link between renal cachexia and cardiovascular mortality in end-stage renal disease patients12345. Am J Clin Nutr. 2011 Sep;94(3):945–54.

31. Martin JF, Kristensen SD, Mathur A, Grove EL, Choudry FA. The causal role of megakaryocyte–platelet hyperactivity in acute coronary syndromes. Nat Rev Cardiol. 2012;9(11):658–70.

32. Kim H, Conway EM. Platelets and Complement Cross-Talk in Early Atherogenesis. Front Cardiovasc Med. 2019 Sep 6;6.

33. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. J Clin Invest. 2005 Dec;115(12):3378–84.

34. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. Physiol Rev. 2006 Apr 1;86(2):515–81.

35. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. J Intern Med. 2014;276(6):618–32.

36. Freynhofer MK, Bruno V, Wojta J, Huber K. The role of platelets in athero-thrombotic events. Curr Pharm Des. 2012;18(33):5197–214.

37. Chávez-Sánchez L, Espinosa-Luna JE, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Montoya-Díaz E, Blanco-Favela F. Innate immune system cells in atherosclerosis. Arch Med Res. 2014 Jan;45(1):1–14.

38. Rotzius P, Thams S, Soehnlein O, Kenne E, Tseng C-N, Björkström NK, et al. Distinct Infiltration of Neutrophils in Lesion Shoulders in ApoE−/− Mice. Am J Pathol. 2010 Jul 1;177(1):493–500.

39. Döring Yvonne, Libby Peter, Soehnlein Oliver. Neutrophil Extracellular Traps Participate in Cardiovascular Diseases. Circ Res. 2020 Apr 24;126(9):1228–41.

40. Nasser MI, Zhu S, Huang H, Zhao M, Wang B, Ping H, et al. Macrophages: First guards in the prevention of cardiovascular diseases. Life Sci. 2020 Jun 1;250:117559.

41. Xu H, Jiang J, Chen W, Li W, Chen Z. Vascular Macrophages in Atherosclerosis. J Immunol Res. 2019 Dec 1;2019.

42. Willemsen L, de Winther MP. Macrophage subsets in atherosclerosis as defined by single-cell technologies. J Pathol. 2020 Jan 31;

43. Chistiakov DA, Kashirskikh DA, Khotina VA, Grechko AV, Orekhov AN. Immune-Inflammatory Responses in Atherosclerosis: The Role of Myeloid Cells. J Clin Med. 2019 Oct 27;8(11).

44. Bonaccorsi I, De Pasquale C, Campana S, Barberi C, Cavaliere R, Benedetto F, et al. Natural killer cells in the innate immunity network of atherosclerosis. Immunol Lett. 2015 Nov;168(1):51–7.

45. Selathurai A, Deswaerte V, Kanellakis P, Tipping P, Toh B-H, Bobik A, et al. Natural killer (NK) cells augment atherosclerosis by cytotoxic-dependent mechanisms. Cardiovasc Res. 2014 Apr 1;102(1):128–37.

46. Zernecke A, Winkels H, Cochain C, Williams JW, Wolf D, Soehnlein O, et al. Meta-Analysis of Leukocyte Diversity in Atherosclerotic Mouse Aortas. Circ Res. 2020 Jul 17;127(3):402–26.

47. Hilgendorf I, Theurl I, Gerhardt LMS, Robbins CS, Weber GF, Gonen A, et al. Innate Response Activator B Cells Aggravate Atherosclerosis by Stimulating TH1 Adaptive Immunity. Circulation. 2014 Apr 22;129(16):1677–87.

48. Aizawa Y, Seki N, Nagano T, Abe H. Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. World J Gastroenterol WJG. 2015 Sep 28;21(36):10299–313.

49. Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. Nature. 2008 Feb 21;451(7181):904–13.

50. Morita S. Metabolism and Modification of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins Involved in Dyslipidemia and Atherosclerosis. Biol Pharm Bull. 2016;39(1):1–24.

51. Qu J, Ko C-W, Tso P, Bhargava A. Apolipoprotein A-IV: A Multifunctional Protein Involved in Protection against Atherosclerosis and Diabetes. Cells. 2019 Apr 5;8(4).

52. Borén J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Eur Heart J. 2020 Jun 21;41(24):2313–30.

53. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003 May 2;92(8):827–39.

54. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017;147:1–73.

55. Wang X, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. Adv Pharmacol San Diego Calif. 2018;81:241–330.

56. Vacek TP, Rehman S, Neamtu D, Yu S, Givimani S, Tyagi SC. Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms. Vasc Health Risk Manag. 2015 Feb 27;11:173–83.

57. Moss JWE, Ramji DP. Cytokines: Roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. Future Med Chem. 2016 Jul;8(11):1317–30.

58. Marques L, Negre-Salvayre A, Costa L, Canonne-Hergaux F. Iron gene expression profile in atherogenic Mox macrophages. Biochim Biophys Acta. 2016;1862(6):1137–46.

59. Cai J, Zhang M, Liu Y, Li H, Shang L, Xu T, et al. Iron accumulation in macrophages promotes the formation of foam cells and development of atherosclerosis. Cell Biosci. 2020 Nov 26;10.

60. Cheng Caroline, Tempel Dennie, van Haperen Rien, van der Baan Arjen, Grosveld Frank, Daemen Mat J.A.P., et al. Atherosclerotic Lesion Size and Vulnerability Are Determined by Patterns of Fluid Shear Stress. Circulation. 2006 Jun 13;113(23):2744–53.

61. Heo K-S, Fujiwara K, Abe J. Shear stress and atherosclerosis. Mol Cells. 2014 Jun;37(6):435–40.

62. Nakajima H, Mochizuki N. Flow pattern-dependent endothelial cell responses through transcriptional regulation. Cell Cycle. 2017 Aug 18;16(20):1893–901.

63. Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998 May;18(5):677–85.

64. Parmar KM, Larman HB, Dai G, Zhang Y, Wang ET, Moorthy SN, et al. Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. J Clin Invest. 2006 Jan 4;116(1):49–58.

65. Wang C, Baker BM, Chen CS, Schwartz MA. Endothelial cell sensing of flow direction. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 Sep;33(9).

66. Lin Zhiyong, Kumar Ajay, SenBanerjee Sucharita, Staniszewski Kristine, Parmar Kush, Vaughan Douglas E., et al. Kruppel-Like Factor 2 (KLF2) Regulates Endothelial Thrombotic Function. Circ Res. 2005 Mar 18;96(5):e48–57.

67. He M, Martin M, Marin T, Chen Z, Gongol B. Endothelial mechanobiology. APL Bioeng. 2020 Feb 20;4(1).

68. Mohan S, Mohan N, Sprague EA. Differential activation of NF-kappa B in human aortic endothelial cells conditioned to specific flow environments. Am J Physiol. 1997 Aug;273(2 Pt 1):C572-578.

69. Fan LM, Geng L, Cahill-Smith S, Liu F, Douglas G, Mckenzie C-A, et al. Nox2 contributes to age-related oxidative damage to neurons and the cerebral vasculature. J Clin Invest. 129(8):3374–86.

70. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest. 2002 May 1;109(9):1125–31.

71. Marathe GK, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Oxidized LDL contains inflammatory PAF-like phospholipids. Trends Cardiovasc Med. 2001 May;11(3–4):139–42.

72. Babendreyer A, Molls L, Dreymueller D, Uhlig S, Ludwig A. Shear Stress Counteracts Endothelial CX3CL1 Induction and Monocytic Cell Adhesion. Mediators Inflamm. 2017;2017:1515389.

73. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nat Rev Immunol. 2011 Oct 10;11(11):762–74.

74. Devaraj S, Yun J-M, Duncan-Staley C, Jialal I. C-reactive protein induces M-CSF release and macrophage proliferation. J Leukoc Biol. 2009 Feb;85(2):262–7.

75. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. Nat Rev Immunol. 2013 Oct;13(10):709–21.

76. Bekkering S, Quintin J, Joosten LAB, van der Meer JWM, Netea MG, Riksen NP. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014 Aug;34(8):1731–8.

77. Hopkins PN. Molecular Biology of Atherosclerosis. Physiol Rev. 2013 Jul 1;93(3):1317–542.

78. Tabas Ira. Consequences and Therapeutic Implications of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Nov 1;25(11):2255–64.

79. Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, Abraham T, Francis GA. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. Circulation. 2014 Apr 15;129(15):1551–9.

80. Feil Susanne, Hofmann Franz, Feil Robert. SM22α Modulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype During Atherogenesis. Circ Res. 2004 Apr 16;94(7):863–5.

81. Allahverdian S, Chaabane C, Boukais K, Francis GA, Bochaton-Piallat M-L. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. Cardiovasc Res. 2018 Mar 15;114(4):540–50.

82. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. J Am Coll Cardiol. 2006 Apr 18;47(8 Suppl):C13-18.

83. Akiba S, Kumazawa S, Yamaguchi H, Hontani N, Matsumoto T, Ikeda T, et al. Acceleration of matrix metalloproteinase-1 production and activation of platelet-derived growth factor receptor beta in human coronary smooth muscle cells by oxidized LDL and 4-hydroxynonenal. Biochim Biophys Acta. 2006 Aug;1763(8):797–804.

84. Nakazato R, Gransar H, Berman DS, Cheng VY, Lin FY, Achenbach S, et al. Statins use and coronary artery plaque composition: results from the International Multicenter CONFIRM Registry. Atherosclerosis. 2012 Nov;225(1):148–53.

85. Shioi A, Ikari Y. Plaque Calcification During Atherosclerosis Progression and Regression. J Atheroscler Thromb. 2018 Apr 1;25(4):294–303.

86. FEDECARDIO | La maladie coronarienne, les traitements [Internet]. https://www.fedecardio.org. 2016 [cited 2020 Apr 20]. Available from: https://www.fedecardio.org/Les-maladies-cardio-vasculaires/Les-traitements-des-maladies-cardio-vasculaires/la-maladie-coronarienne

87. Alderman EL, Corley SD, Fisher LD, Chaitman BR, Faxon DP, Foster ED, et al. Five-year angiographic follow-up of factors associated with progression of coronary artery disease in the Coronary Artery Surgery Study (CASS). CASS Participating Investigators and Staff. J Am Coll Cardiol. 1993 Oct;22(4):1141–54.

Chapitre II : Monocytes et macrophages

Face à l'absence de méthodes diagnostiques et thérapeutiques ciblant spécifiquement les plaques d'athérosclérose à risque de rupture, la recherche actuelle se focalise sur l'étude des cellules majoritairement impliquées dans le développement et l'évolution des plaques : les macrophages (1). De nombreuses sous-populations de macrophages ont d'ailleurs été reliées à la vulnérabilité des plaques.

I. Second prélude historique

Les macrophages ont été parmi les premières cellules du système immunitaire à être décrites, à partir de la seconde moitié du 19ème siècle. C'est l'association des travaux d'Elie Metchnikoff sur la théorie de la phagocytose (2) et de ceux de Paul Ehrlich sur le développement de colorations cytologiques permettant l'observation morphologique des cellules (3), qui a permis de mettre en évidence différents types de cellules dont certaines capables de phagocyter des éléments étrangers. Ces découvertes leur ont valu d'obtenir, en 1908, le prix Nobel de Physiologie, à une époque où la polémique entre la théorie cellulaire et la théorie humorale de l'immunité n'était pas résolue (4). Le terme « monocyte » aurait été introduit pour la première fois en 1910 par Pappenheim (5) pour désigner de manière théorique les cellules à l'origine des macrophages, avant d'être appliqué aux cellules qu'Ehrlich appelait « cellules translationnelles » (maintenant reconnues comme étant les monocytes) une quinzaine d'années plus tard. C'est ensuite en 1939 que la capacité migratoire des monocytes ainsi que leur différenciation en macrophages ont été montrées (6). L'étude et la caractérisation des monocytes se sont poursuivies et sont toujours d'actualité, en particulier en ce qui concerne l'origine des macrophages ainsi que leur fonction.

II. Monocytes et macrophages, cellules du système des phagocytes mononucléés

II. A. Origines des macrophages

II. A. 1) Monocytopoïèse et hétérogénéité monocytaire

Au fil des années, les connaissances concernant l'origine des monocytes et macrophages ont fortement évolué. Dans les années 70, on démontre que les monocytes se différencient à partir de cellules souches hématopoïétiques, processus appelé monocytopoïèse, dans la moelle osseuse (7,8) (Figure 9). Brièvement, la cellule souche hématopoïétique se différencie en progéniteur multipotent puis en progéniteur myéloïde commun puis en progéniteur granulo-monocytaire, en enfin en monocyte. Ces monocytes transitent ensuite via la circulation sanguine afin d'atteindre les tissus où ils se différencient en cellules dendritiques ou en macrophages appelés alors « macrophages dérivés de monocytes (MDM) ».

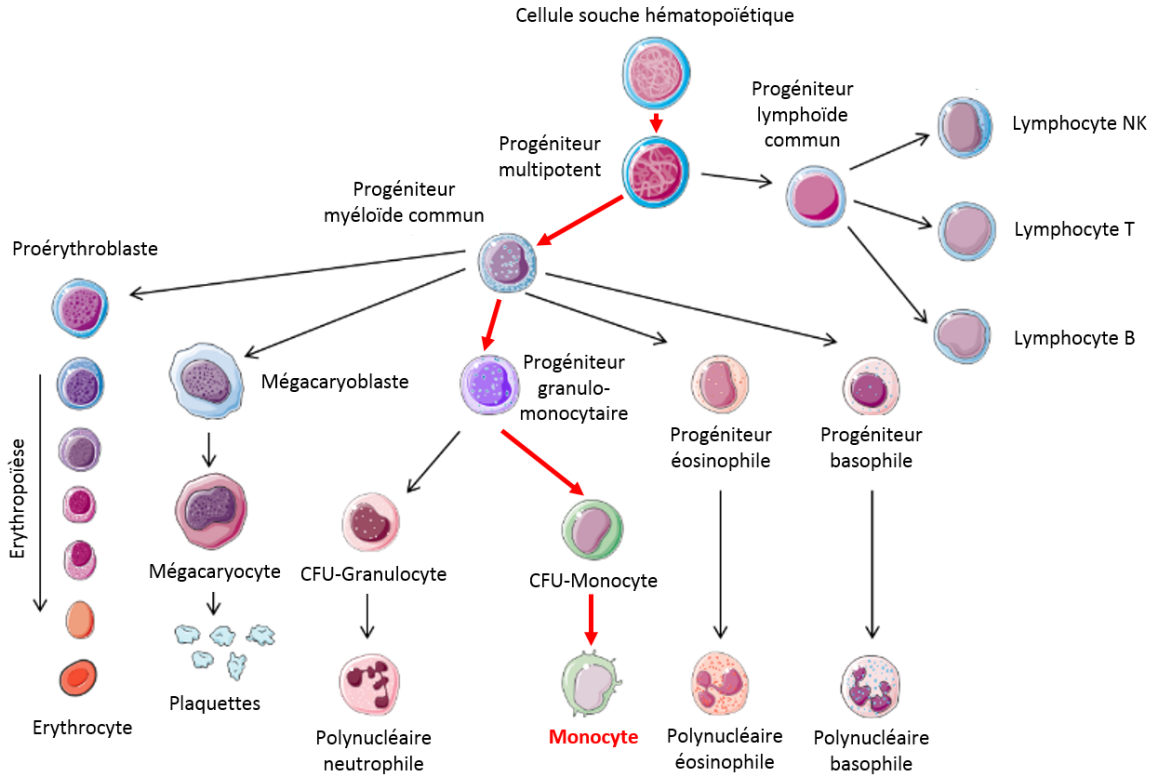


Figure 9 : Hématopoïèse. La cellule souche hématopoïétique est à l'origine du processus d'hématopoïèse et donc, de toutes les cellules sanguines. C'est une cellule multipotente capable de s'auto-renouveler. Elles vont donner naissance dans un premier temps aux Progéniteur multipotents qui n'ont plus la capacité de s'auto-renouveler, mais qui sont toujours capables de donner naissance à toutes les cellules hématopoïétiques. Le progéniteur commun se différencie ensuite, soit en progéniteur lymphoïde commun à l'origine des lymphocytes, soit en progéniteur myéloïde commun, à l'origine des érythrocytes, plaquettes, granulocytes et monocytes. Dans le cas de la monocytopoïèse (représentée par les flèches rouges), le progéniteur myéloïde commun se différencie en progéniteur granulo-monocytaire puis en CFU (Colony Forming Unit)-monocyte et enfin en monocyte. Une fois arrivées à maturation, les cellules vont quitter la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine.

En 2009, l'équipe de Swirski démontre qu'il existe, chez la souris, un pool de monocytes provenant de précurseurs médullaires et stockés en grappes au niveau de la pulpe rouge de la rate (9). Ils démontrent également que ces monocytes sont en nombre supérieur à ceux présents dans le sang, et qu'à la suite d'un infarctus, ils sont capables de migrer vers les tissus enflammés afin de les réparer. Ce serait la libération d'angiotensine II et d'IL-1β dans la circulation sanguine causée par l'accident vasculaire qui recruterait les monocytes de la rate. Par ailleurs, les monocytes s'accumulant au niveau de la zone endommagée proviendraient davantage de la rate que du sang. Ce pool splénique permettrait donc un recrutement rapide et massif de monocytes.

Afin de pouvoir migrer vers les tissus et les zones inflammatoires, les monocytes possèdent à leur surface de nombreux récepteurs aux chimiokines, tels que CCR1, CCR2, CCR5 et CX_3CR1. Par exemple, le CCR2, récepteur de la cytokine CCL2, permet le recrutement des monocytes. Les récepteurs CCR1 et CCR5 sont responsables de l'arrêt des monocytes sur la paroi endothéliale via CCL1 et via CCL5. Les monocytes possèdent également de nombreuses molécules leur permettant de se lier aux cellules endothéliales : L-sélectine, PSGL1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*), LFA1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*), VLA4 (*very late antigen 4*), PECAM1. La L-sélectine, PSGL1, VLA4 et LFA1 interagissent respectivement avec les récepteurs endothéliaux PNAd (*peripheral lymph node addressin*), P-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1 (10). La Figure 10 représente quelques récepteurs et cytokines impliqués dans l'arrêt des monocytes et leur passage à travers l'endothélium.

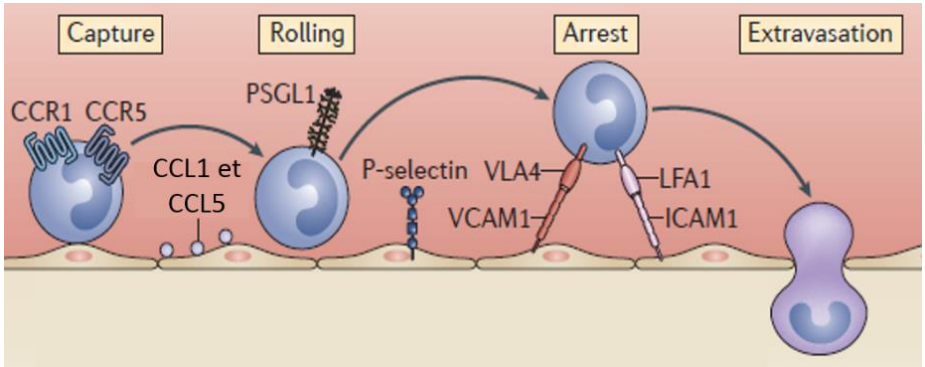


Figure 10 : Passage de l'endothélium par les monocytes. Adapté de Moore K. et al Nat. Rev. Immunol. 2014. Les monocytes sont ralentis au niveau des cellules endothéliales grâce à la liaison entre leurs récepteurs CCR1 et CCR5, et les cytokines CCL1 et CCL5 présentes sur les cellules endothéliales. La liaison de PSGL1 (monocytes) sur la P-sélectine (cellules endothéliales) va ralentir davantage les monocytes. L'arrêt complet des monocytes sur l'endothélium est permis grâce à la liaison de VLA4 et LFA1, respectivement, sur VCAM1 et ICAM1 permettant ainsi le passage de l'endothélium.

Les monocytes possèdent également des marqueurs de différenciation (*cluster of differentiation* (CD)) tels que CD14 et CD16, respectivement co-récepteur du LPS (avec le TLR4) et récepteur au fragment constant (Fc) des immunoglobulines. Trois sous-populations de monocytes ont été identifiées chez l'Homme en fonction de la proportion des marqueurs de différenciation CD14 et CD16 : les monocytes classiques (85%), intermédiaires (5%) et non-classiques (10%) (11).

Les **monocytes classiques** possèdent le CD14 mais pas le CD16 ($CD14^{++}/CD16^{-}$). Les monocytes classiques restent environ un jour dans la circulation sanguine avant de, soit gagner les tissus et devenir des macrophages tissulaires dérivés de monocytes, soit devenir des monocytes intermédiaires puis non-classiques (12,13). Les monocytes classiques ont la particularité d'exprimer fortement les récepteurs CCR2 et L-sélectine, et faiblement CX_3CR1 et CCR5. Ils présentent également une forte expression du CD36 (14). Après stimulation au LPS, ils sécrètent de l'IL-10, de l'IL-6, de l'IL-8, du TNF-α, de l'IL-1β ainsi que CCL2. Enfin, ces monocytes expriment de nombreux gènes en lien avec la phagocytose, la sécrétion de protéines antimicrobiennes (ROS), l'angiogenèse, et la coagulation, et ont un métabolisme basé sur l'utilisation des carbohydrates (15). Les monocytes classiques ont donc un rôle majoritaire dans la réponse innée aux pathogènes et dans la réparation tissulaire (16).

Les **monocytes non-classiques** possèdent plus de CD16 que de CD14 ($CD14^{+}/CD16^{++}$). Ils présentent une plus longue durée de vie, environ sept jours et, contrairement aux monocytes classiques, ils n'expriment pas CCR2, la L-sélectine et le CD36, mais expriment fortement CX_3CR1 qui favorise la survie cellulaire (via l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*) et permet la migration des monocytes vers les lésions inflammatoires (14,16–18). Les monocytes non-classiques ont un métabolisme basé davantage sur l'utilisation des voies oxydatives et de la mitochondrie que sur l'utilisation des carbohydrates (15). Ils sont considérés comme des patrouilleurs dans la circulation sanguine (13) et interviennent également dans l'élimination des cellules endothéliales endommagées afin de maintenir l'intégrité vasculaire (16).

Les **monocytes intermédiaires** possèdent davantage de CD14 que de CD16 ($CD14^{++}/CD16^{+}$). Ils ont une durée de vie d'environ quatre jours (13). Les monocytes intermédiaires constituent, comme leur nom l'indique, une population intermédiaire entre les monocytes classiques et non-classiques car ils partagent des caractéristiques communes avec les deux autres sous-types de monocytes. En effet, ils expriment à la fois CCR1 et CCR2, mais également CX_3CR1 et fortement le CD36 (14,16). Cependant, le marqueur qui permet de les distinguer est le CCR5 qu'ils expriment fortement. Il a été montré que l'expression de CCR5 est associée à une progression de l'athérosclérose (19,20), ce qui est concordant avec l'augmentation de cette sous-population de monocytes dans le sang dans le cas d'un événement cardiovasculaire (21,22). De plus, ces monocytes sont davantage impliqués dans l'endocytose des lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons et VLDL) qui vont induire l'expression des récepteurs VLA4 et CD11c/CD18 impliqués dans l'arrêt des monocytes au niveau de la paroi vasculaire (23).

Finalement, la distinction entre ces trois sous-types de monocytes reposant sur la proportion des CD14/CD16 ne les rend pas pour autant complètement dissociés les uns des autres. À la suite d'une

injection de LPS, ce sont d'abord les monocytes classiques qui apparaissent, suivis des intermédiaires puis des non-classiques (13), ces derniers étant considérés comme les plus matures (16).

Etant donné que les modèles murins sont souvent utilisés, le Tableau 3 ci-dessous compare les sous-classes de monocytes humains et murins :

Tableau 3 : Comparaison entre les sous-classes de monocytes humains et murins. Les monocytes humains sont divisés en trois sous-classes : les monocytes classiques exprimant beaucoup le CD14 et pas le CD16, les monocytes non-classiques (aussi appelés alternatifs) exprimant peu le CD14 et beaucoup le CD16, et les monocytes intermédiaires exprimant le CD16 et beaucoup le CD14. Les monocytes murins sont divisés en deux sous-classes : les monocytes classiques exprimant beaucoup le Ly6C, le CCR2 et un peu le CX_3CR1, et les monocytes non-classiques exprimant peu le Ly6C, pas le CCR2 et beaucoup le CX_3CR1 (13).

SOUS-CLASSES DE MONOCYTES	HOMME	SOURIS
CLASSIQUES	$CD14^{++}/CD16^{-}/CCR2^{++}/CX_3CR1^{-}/CCR5^{-}$	$Ly6C^{++}/CCR2^{+}/CX_3CR1^{+}$
NON-CLASSIQUES	$CD14^{+}/CD16^{++}$ $CCR2^{-}/CX_3CR1^{++}/CCR5^{-}$	$Ly6C^{+}/CCR2^{-}/CX_3CR1^{++}$
INTERMEDIAIRES	$CD14^{++}/CD16^{+}$ $CCR2^{+}/CX_3CR1^{+}/CCR5^{++}$	

II. A. 2) Origine embryonnaire : macrophages résidents

Les recherches de la dernière décennie ont mis en évidence une seconde origine des macrophages présents dans les tissus. Il a été montré que la plupart des macrophages tissulaires ne provenaient pas de la différenciation de monocytes circulants issus de l'hématopoïèse mais étaient issus de précurseurs dérivés du sac vitellin ou du foie fœtal différenciés en macrophages lors du développement fœtal (24). Ces macrophages tissulaires sont appelés « macrophages résidents ». Ils ont conservé la capacité d'auto-renouvellement (25) qui perdure plus ou moins longtemps en fonction des tissus : de plusieurs mois à plusieurs années pour le cerveau (26), le foie (27), les poumons (28) et la peau (12), et quelques mois pour les macrophages intestinaux (29), ces derniers coexistant avec les MDM. A noter que, plus la capacité d'auto-renouvellement est longue, moins il y a de monocytes recrutés. De plus, il a également été montré qu'avec l'âge la capacité d'auto-renouvellement diminuait et que les macrophages d'origine embryonnaire étaient progressivement remplacés par des MDM (30). Les macrophages résidents du cœur sont distinguables des macrophages recrutés par l'absence du récepteur CCR2 (récepteur de la chimiokine CCL2), responsable du recrutement des macrophages (31).

II. B. Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des macrophages

II. B. 1) Fonctions des macrophages

Les macrophages font partie de l'immunité innée. Ce sont des phagocytes professionnels qui ont pour rôle de surveiller l'environnement afin d'éliminer les cellules sénescentes, les débris cellulaires et les agents infectieux. Ils jouent donc un rôle important dans la surveillance immunitaire et l'homéostasie tissulaire en intervenant dans l'inflammation et sa résolution (réparation tissulaire).

Reconnaissance et élimination des pathogènes, fonction inflammatoire

Les macrophages « tâtent » l'environnement grâce à prolongements cellulaire appelés pseudopodes. A leur surface, différents récepteurs leur permettent de reconnaître différents pathogènes : soit de manière directe via leurs les PRR (*Pathogen Recognition Receptor*) reconnaissant des motifs « signatures » (PAMP : *Pathogen Associated Molecular Pattern*) présents sur les bactéries, les virus et les parasites, soit de manière indirecte via leurs récepteurs au fragment constant des anticorps (RFc) et leurs récepteurs au complément (RC) qui peuvent interagir avec des pathogènes recouverts par des molécules du complément ou des anticorps spécifiques. L'engagement de ces récepteurs déclenche l'activation des macrophages qui phagocytent et dégradent les pathogènes ou débris pour en présenter des fragments aux lymphocytes T, et qui sécrètent des cytokines inflammatoires (IL-6, IL-1, TNF-α) soutenant l'inflammation. Cette présentation de l'antigène aux cellules T se fait grâce au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les protéines du CMH de classe I (CMH-I) sont présentes sur toutes les cellules nucléées et servent à présenter les antigènes d'origine endogène (ou exogène via la présentation croisée). Les protéines du CMH de classe II (CMH-II) sont présentes sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes B) et servent à présenter les antigènes d'origine exogène. En pratique, la CPA activée peut présenter l'antigène chargé sur le CMH-I aux lymphocytes T CD8+ induisant une réponse cytotoxique, et chargé sur le CMH-II aux lymphocytes T CD4+ qui régulent à la fois une réponse humorale et la réponse à médiation cellulaire. La présence d'un pathogène ou de débris est à l'origine de l'inflammation et rend les macrophages inflammatoires. Ceux-ci acquièrent ensuite une morphologie, un phénotype et des fonctions qui leurs sont propres. Les macrophages peuvent également détecter et répondre à des signaux provenant de la matrice extracellulaire. Par exemple, des facteurs solubles appelés « chimiokines » présentent des propriétés chimio-attractantes qui attirent les macrophages vers le lieu de l'inflammation tandis que d'autres molécules solubles, les cytokines produites par les cellules environnantes (elles aussi en contact avec les pathogènes) activent les macrophages ou renforcent leur activation.

Efferocytose

Outre leur rôle dans la destruction des pathogènes, les macrophages interviennent également dans l'homéostasie en éliminant les cellules sénescentes et apoptotiques, processus immunologique non inflammatoire dénommé « efferocytose ». Par exemple, les macrophages éliminent en moyenne 2.10^{11} érythrocytes sénescents par jour, ce qui équivaut à un recyclage de 3kg de fer et d'hémoglobine par an (32) ! Ce turnover homéostatique impliquant les macrophages repose sur différents signaux. Le recrutement des phagocytes est médié par la libération d'ATP ou d'UTP par les cellules apoptotiques (33). Le signal de reconnaissance et donc de phagocytose des cellules apoptotiques majoritaire est la présence de phosphatidylsérine à la surface des cellules apoptotiques. Les phosphatidylsérines sont normalement transférées de la membrane externe à la membrane interne par des enzymes appelées « flippases ». Dans le cas de cellules apoptotiques, les flippases sont inhibées par les caspases et les phosphatidylsérines se retrouvent exposées à la membrane externe de la cellules (34). Elles vont alors être reconnues par des protéines solubles telles que ProS/Gas6 ou MFG-E8 qui font le lien entre les macrophages et les phosphatidylsérines. Les sites de liaison de ProS/Gas6 et MFG-E8 sur les macrophages sont, respectivement, les récepteurs TMA (Tyro3, MerTK et Ax1) et le complexe des intégrines $\alpha_v\beta_{3/5}$ (35,36). Les macrophages résidents possèdent en plus le récepteur Tim4 qui fait le lien directement entre les phosphatidylsérines et les macrophages. Cependant il n'est pas capable d'induire à lui seul le signal de phagocytose et c'est via les récepteurs MerTK et intégrines $\alpha_v\beta_3$ qu'il transmet ce signal (37). En revanche, l'élimination des cellules nécrotiques, des débris cellulaires qui en découlent et des molécules oxydées, est un processus immunologique inflammatoire. En effet, la nécrose étant un processus pathologique, les débris cellulaires vont alors se fixer sur les récepteurs de danger des macrophages, les activer et induire la production de médiateurs pro-inflammatoires dans l'objectif d'éliminer l'origine de la nécrose des cellules.

Elimination des lipides en excès ou modifiés

Les macrophages sont également chargés d'éliminer les lipides et le cholestérol en excès ainsi que les molécules oxydées par le stress oxydant telles que les LDLox. Les lipoprotéines sont endocytées par les macrophages via le LDLR des macrophages. Les esters de cholestérol contenus dans les lipoprotéines sont hydrolysés en cholestérol libre par la lipase acide dans les lysosomes, lequel est ensuite transporté jusqu'à la membrane plasmique où il peut être pris en charge par les transporteurs ABCA1 et ABCG1 qui réalisent l'efflux de cholestérol (38,39). L'excès de cholestérol libre intracellulaire est estérifié par l'enzyme ACAT-1 (*acyl-CoA :cholesterol acyl-transferase 1*) dans le réticulum endoplasmique et stocké dans des gouttelettes lipidiques (39). Les LDLox, quant à elles, sont des molécules physiopathologiques reconnues par des récepteurs différents de ceux liant les LDL non modifiées, tels que SR-A, SR-B, SR-EC1, MARCO, CD36 et LOX1 (1). La liaison des LDLox sur ces récepteurs entraine une inflammation

vasculaire via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β), une dysfonction endothéliale ainsi que la formation de macrophages spumeux (lorsque ceux-ci ingèrent davantage de lipoprotéines qu'ils n'en éliminent) (40). De manière générale, ces récepteurs induisent des actions pro-athérogènes.

Fonction immunorégulatrice

Les macrophages n'ont pas qu'une fonction d'élimination, ils interviennent également dans la réparation tissulaire, par suite des dommages causés par l'inflammation. Ces macrophages ne sont alors plus pro-inflammatoires mais immunorégulateurs. Ceux-ci produisent principalement du TGF-β afin d'activer les fibroblastes pour induire la réparation tissulaire (41) et stimulent les facteurs de croissance, tels que le VEGF, pour activer l'angiogenèse (42). Le passage d'un phénotype pro-inflammatoire à immunorégulateur apparait 3 à 7 jours après l'infection. Cependant l'excès de macrophages anti-inflammatoires peut aboutir à un dépôt excessif de collagène responsable de scléroses tissulaires (43).

II. B. 2) Distinction fonctionnelle entre les MDM et les macrophages résidents

Même si tous les macrophages sont théoriquement capables de réaliser ces processus d'élimination et de réparation, en réalité leur fonction varie selon leur origine et l'environnement tissulaire. Par exemple, lors d'une infection ce sont les macrophages résidents qui donnent l'alerte afin de recruter les MDM qui seront les seuls responsables de la phagocytose des pathogènes. Concernant les maladies non infectieuses, la fonction des macrophages résidents et des MDM diffère également. En 2017, Molawi et ses collaborateurs ont montré, que la fibrose du poumon est liée aux MDM et non aux macrophages résidents (28). Dans le cas des macrophages cardiaques, les macrophages résidents, présentant un meilleur potentiel d'efferocytose et de réparation, semblent être davantage impliqués dans la réparation du tissu cardiaque que les MDM (44,45). L'évolution au cours du temps de la proportion de macrophages résidents par rapport aux MDM dépend de la pathologie et du tissu (Figure 11). Dans le cas d'un infarctus du myocarde, les MDM sont recrutés et remplacent progressivement les macrophages résidents qui meurent rapidement dans le tissu touché par l'infarctus. Quelque temps après l'infarctus, les macrophages résidents des tissus alentours prolifèrent et réparent le tissu endommagé (46,47). En revanche, dans le développement des plaques d'athérome et après un AVC, les macrophages résidents (microglie dans le cerveau) sont toujours présents même si des MDM sont recrutés (46).

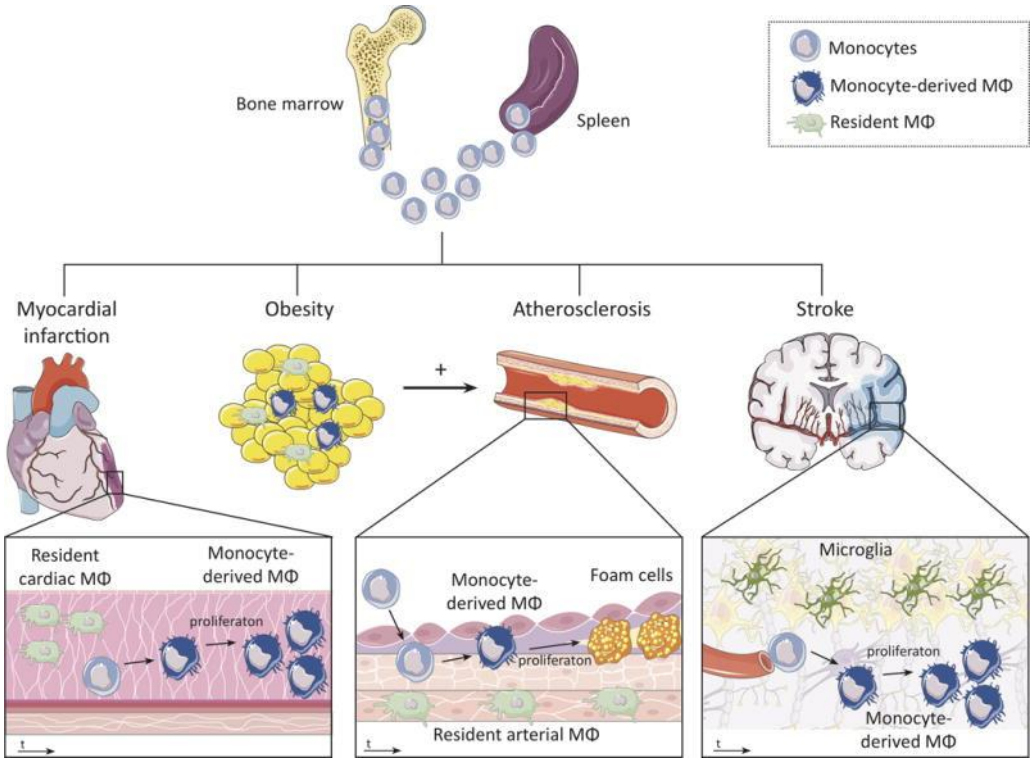


Figure 11 : Macrophages résidents et MDM dans les maladies cardiovasculaires. Honold, et al 2018 in Circulation Research. Après un infarctus du myocarde ou un AVC, et pendant le développement des plaques d'athérome, les monocytes médullaires issus du pool splénique sont recrutés dans les tissus endommagés. Dans le cas de l'infarctus du myocarde les macrophages résidents disparaissent tandis qu'au cours de l'athérogenèse et après un AVC les macrophages résidents sont présents en même temps que les MDM.

Une autre étude a montré que, même si les macrophages résidents de l'aorte sont les premiers à réaliser l'internalisation des lipides s'accumulant dans les artères et à devenir spumeux, ils ne sont pas suffisants pour induire la progression des plaques. Ce sont les monocytes recrutés qui vont alimenter cette progression. En revanche, cette même étude ne détecte pas la présence de macrophages résidents dans les plaques avancées (48). Il semble finalement admis que les macrophages résidents soient responsables de la réparation tissulaire et les MDM de l'inflammation.

II. B. 3) Description et rôles des principaux modèles de macrophages

Afin de pouvoir étudier ces macrophages *in vitro*, il a été développé dans les années 2000 des modèles de macrophages mimant les macrophages inflammatoires et immunorégulateurs, nommés respectivement M1 et M2 (49,50).

Le **modèle M1** est obtenu après une activation dite « classique » correspondant à une stimulation avec du LPS et de l'IFN-γ. Les macrophages M1 sont caractérisés par un profil pro-inflammatoire via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-12) et de molécules anti-microbiennes (NO, ROS), et présentent également une forte capacité à présenter les antigènes via le CMH-II (51). Les

macrophages de type M1 présentent à leur surface de nombreux marqueurs pro-inflammatoires, tels que CD80, CD86, CD40, CD197, MARCO, TLR2, TLR4 (42,50,52).

Le **modèle M2** est issu d'une activation « alternative » via les cytokines IL-4, IL-10 et IL-13 aboutissant aux macrophages immunorégulateurs. Ces derniers sécrètent principalement de l'IL-10 et du TGF-β et présentent à leur surface les récepteurs CD206 (ou mannose récepteur MR), CD163, CD36 (récepteur scavenger) (42,50,52). Les macrophages M2 sont très diversifiés et trois sous-populations ont été identifiées : M2a, M2b et M2c (50). Les M2a sont induits par l'IL-4 et l'IL-13, les M2b par les complexes immuns ou par la liaison au TLR4, et les M2c par l'IL-10 (Figure 12).

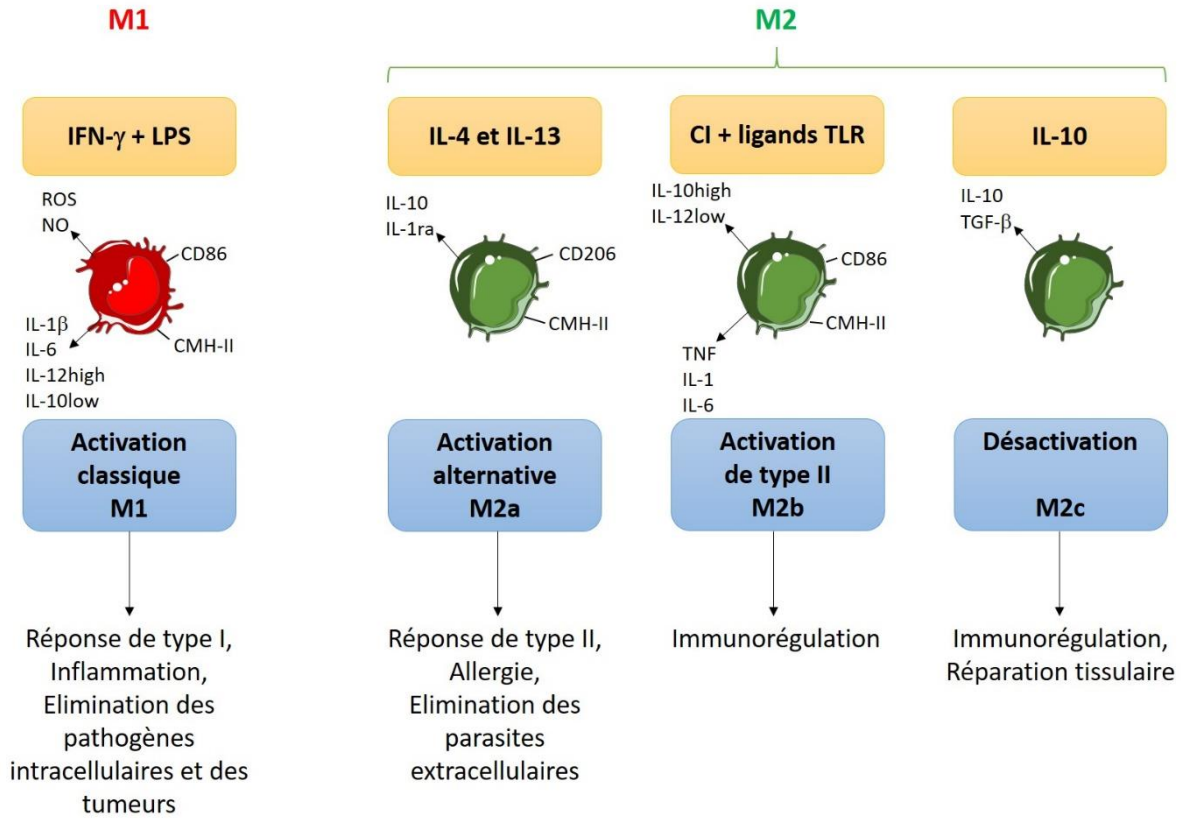


Figure 12 : Activateurs et fonctions des différents modèles de macrophages. A partir de Mantovani, et al, 2004 in Trends in Immunology. Les macrophages exposés à l'IFN-γ et au LPS aboutissent à la polarisation de type M1 (activation classique) avec des propriétés cytotoxiques et anti-tumorales. A l'inverse, les macrophages de type M2 participent à l'immunorégulation et à la progression des tumeurs, en particulier les M2a (induits par l'IL-4 et l'IL-13) et les M2b (induits par l'exposition aux complexes immuns et aux ligands des TLR). Les M2c, quant à eux, sont davantage impliqués dans la réparation tissulaire.

Actuellement, la pertinence de ces modèles est remise en question. En effet, les façons d'obtenir ces modèles varient selon les études utilisant alternativement une différenciation avec du M-CSF ou du GM-CSF suivie d'une activation avec de l'IFN-γ seul ou avec du LPS pour obtenir des macrophages inflammatoires. Pour obtenir des macrophages immunorégulateurs, les monocytes sont généralement différenciés en présence de M-CSF et les macrophages activés avec de l'IL-4 seule ou en présence d'IL-10 (pour la souris) et d'IL-13 (pour l'homme). Les modèles ainsi obtenus sont indistinctement nommés M1 et M2 respectivement, alors qu'ils sont basés sur des stimuli différents biaisant la comparaison des

résultats obtenus dans les différentes études. Une alternative, proposée par Murray, *et al* en 2014, était d'homogénéiser les modèles cellulaires via une activation standard (IL-4 ou IFN-γ), via la description précise des méthodes d'isolement des macrophages et des milieux et cytokines utilisés, et via l'utilisation d'une nomenclature basée sur la définition de l'activateur des macrophages (pour ne plus présupposer de l'état des macrophages), comme par exemple M(IL-4) au lieu de M2 (53). Par ailleurs, ces modèles cellulaires *in vitro* ne peuvent pas mimer les cellules présentes *in vivo* car le microenvironnement complexe dans lequel baignent les cellules *in vivo* ne peut pas se résumer à deux ou trois cytokines. De plus, il n'existe pas de marqueur exprimé spécifiquement par un seul type de macrophages. En revanche, Il existe des marqueurs communs dont le niveau d'expression varie de manière tenue, ce qui a permis de classer les différents phénotypes observés en quelques sous-populations plus ou moins distinctes. Néanmoins cette classification, loin de permettre une vision représentative de la réalité, en offre une vision simplifiée et a permis de mettre en évidence la nécessité de se focaliser plus sur la fonction effective des cellules que sur leur analyse phénotypique ou, tout au moins, de relier de façon plus systématique fonction et phénotype.

III. Macrophages et plaques d'athérosclérose

A l'image de ce qui est observé dans une inflammation d'origine infectieuse où la phase inflammatoire est suivie d'une phase de réparation, dans l'athérosclérose, l'inflammation chronique de l'endothélium vasculaire induisant le recrutement de monocytes à l'origine des macrophages spumeux, des cellules apoptotiques et des débris cellulaires soutenant l'inflammation, est suive d'une phase de réparation initiée par la formation d'une chape fibreuse épaisse constituée notamment de collagène. Ainsi les macrophages impliqués dans l'initiation et la progression des plaques sont considérés comme pro-athérogènes et ceux impliqués dans la réparation des plaques comme anti-athérogènes (54,55) ; la progression vers la rupture étant considérée comme étant en partie liée à la balance entre ces deux types de macrophages.

III. A. Localisations et fonctions des macrophages dans l'athérosclérose

Les marqueurs exprimés à la surface des macrophages pro-inflammatoires M1 et des macrophages anti-inflammatoires M2 sont appelés « marqueurs M1 et M2 », respectivement. Les deux types de marqueurs ont été observés au cours de l'athérogenèse. Leur apparition varie en fonction du stade d'évolution de la plaque. De plus, ces marqueurs sont situés dans des zones différentes de la plaque. Ainsi Stöger, et al ont montré par une quantification des marqueurs M1 CD86 et iNOS (*inducible Nitric Oxyde Synthase*) en immunohistochimie (IHC), que les macrophages inflammatoires étaient majoritairement présents dans une zone située entre le corps nécrotique et la chape fibreuse, une région souvent définie par ailleurs comme à risque de rupture (56). Ces macrophages entretiennent l'inflammation en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et des MMPs qui dégradent les tissus ; ils sont donc associés à des effets délétères sur la stabilité de la plaque, et considérés comme pro-athérogènes (57). L'observation des marqueurs M2 (CD163 et CD206) en IHC a permis de révéler que les macrophages immunorégulateurs, quant à eux, sont principalement présents au niveau de l'adventice (56). Ils possèdent une forte activité de phagocytose, ce qui fait qu'on les retrouve également majoritairement dans les plaques hémorragiques afin d'éliminer les érythrocytes (56). Finn, et al ont montré que la présence d'hémoglobine dans les zones hémorragiques intraplaques changeait le phénotype des M2 (58) : les macrophages activés par l'hémoglobine présentent une augmentation du CD163 (responsable de la prise en charge de l'hème) ainsi qu'une diminution du CD36 et de la quantité de lipides intracellulaires par rapport aux macrophages activés avec de l'IL-4 (58). Cette diminution de lipides intracellulaires serait due au fait que le fer présent dans les macrophages activés par l'hémoglobine induit la surexpression des transporteurs ABCA1 et ABCG1, responsables de l'efflux de cholestérol, et la diminution de l'expression du CD36, responsable de l'internalisation de lipides, empêchant ainsi ces macrophages de devenir spumeux. De manière générale, les M2 sont associés avec la régression des plaques via l'inhibition de l'inflammation, l'efferocytose des cellules apoptotiques et nécrotiques (diminuant ainsi la taille du cœur nécrotique) et l'inhibition de la synthèse des métalloprotéinases (arrêt de la dégradation de la matrice extracellulaire, permettant la stabilisation des plaques) (59–62).

Les macrophages spumeux sont responsables de l'élimination des lipides et du cholestérol en excès ainsi que des lipoprotéines oxydées. Ils sont situés proche du cœur lipidique nécrotique. Lorsque le processus d'efflux du cholestérol n'est plus opérationnel (63), les macrophages spumeux entrent en apoptose, et, s'ils ne sont pas éliminés par les macrophages environnants, ils finissent par se nécroser formant ainsi le cœur nécrotique. Cela explique leur association avec une augmentation de la sévérité de la maladie (64).

Par ailleurs, la quantité de macrophages présents dans les plaques dépend de la possibilité des macrophages à émigrer hors de la plaque. Celle-ci est reliée à la présence de signaux de rétention, tels que CD146, Netrin-1 et Semaphorin 3A (65). Ces signaux diminuent la mobilité et la capacité migratoire des macrophages qui s'accumulent au sein des plaques, renforçant ainsi l'inflammation et leur progression (66,67). A l'inverse, l'activation de la voie des SREBPs augmente l'expression du CD197 responsable de l'émigration des macrophages hors des plaques d'athérome, induisant la régression de celles-ci (68).

III. B. Hétérogénéité phénotypique et ontogénique des macrophages dans la plaque

Les macrophages spumeux sont vraisemblablement les plus représentés dans la plaque. Ils sont en effet à l'origine de la formation du cœur nécrotique pro-thrombotique qui est l'élément clé de la vulnérabilité. Plusieurs questions se posent concernant ces macrophages : de quelles cellules découlent-ils ? ; sont-ils dérivés de macrophages résidents ou de monocytes sanguins recrutés dans la plaque ? ; s'ils dérivent de ces derniers, dérivent-ils d'une sous-population particulière de monocytes (classique, intermédiaire ou alternative) ? ; ont-ils un profil pro-inflammatoire ou immunorégulateur leur permettant d'exprimer les marqueurs observés dans la plaque ? ont-ils un profil particulier qui ne permettrait pas de les définir selon cette vision très duelle de la fonctionnalité macrophagique (pro- vs anti-inflammatoire) ? Par ailleurs, il est de plus en plus vraisemblable, grâce à l'étude des marqueurs observés dans les plaques d'athérome et leurs localisations distinctes, que diverses populations de macrophages aux fonctions distinctes coexistent dans la plaque.

III. B. 1) Origine des macrophages spumeux

III. B. 1) a) Quels sous-types de monocytes ?

A l'heure actuelle, de nombreuses études montrent l'importance des monocytes classiques et intermédiaires dans le développement des plaques. Même si le lien entre les monocytes et leur devenir en macrophages spumeux n'est pas encore bien établi, l'étude de ces sous-classes de monocytes est importante pour comprendre comment les monocytes influencent le développement des macrophages spumeux. Des contradictions persistent quant au lien entre les monocytes classiques et

un événement cardiovasculaire : Berg et collaborateurs ont réalisé une étude sur 700 patients atteints d'athérosclérose. Ils ont mesuré la proportion de monocytes classiques dans le sang des patients, puis, après plusieurs années, ils ont comparé cette proportion entre les patients ayant eu un événement cardiovasculaire et ceux n'en ayant pas eu. Ils mettent ainsi en évidence que les personnes ayant eu un accident avaient dans leur sang davantage de monocytes classiques que celles n'ayant pas eu d'accident. Ils en concluent que les monocytes classiques peuvent être utilisés comme un marqueur sanguin de prédiction d'événements cardiovasculaires (69). A l'inverse, Meeuwsen, *et al*, démontrent, à partir d'une étude sur 175 patients comparant la composition de leurs plaques d'athérome avec leur proportion en monocytes classiques, que ces derniers ne sont pas en nombre supérieur dans les plaques à risque. Ils en concluent que les monocytes classiques ne sont pas associés à la présence d'une plaque à risque de rupture (70). A noter que cette dernière étude ne se base pas sur l'apparition réelle d'un événement cardiovasculaire, contrairement à celle de Berg, mais seulement sur la présence d'une plaque potentiellement à risque de rupture selon sa composition. Par ailleurs, d'autres auteurs ont montré que les monocytes intermédiaires étaient en proportion plus importante que les monocytes classiques et non-classiques dans le sang de personnes atteintes d'occlusions artérielles périphériques (22). Cette différence souligne donc la nécessité d'homogénéiser les techniques d'étude ainsi que le moment des prélèvements (sang et plaque). Il faut vérifier que les techniques de cytométrie en flux sont bien comparables entre elles au niveau des interprétations. Le moment du prélèvement a aussi une grande importance, si le sang est prélevé bien avant l'événement cardiovasculaire (et donc bien avant la récupération de la plaque d'athérome), on peut considérer les résultats de cytométrie concernant la proportion de monocytes comme un marqueur de prédiction. Cependant, si le sang est prélevé au même moment que la plaque, juste après un événement cela ne permet pas de conclure que telle sous-population de monocytes est un marqueur de prédiction mais plutôt qu'elle est surexprimée juste après un événement, et donc qu'elle est probablement recrutée pour réparer les dégâts. D'où l'importance de comprendre le devenir des sous-types de monocytes dans la plaque, car, par exemple, les monocytes classiques sont présents dès le début mais, selon Meeuwsen ils ne seraient plus présents dans les plaques à risque de rupture. La présence de chaque sous-type dépendrait donc plutôt du stade de progression des plaques : dans les phases précoces du développement des plaques, les niveaux élevées de CCL2 sont révélateurs d'une proportion plus élevée de monocytes classiques tandis que pour les plaques avancées, la présence du cœur nécrotique induit le recrutement de monocytes non-classiques ($CCL2^-/CX3CR1^+$) pour éliminer les débris (71). Cependant, la contribution des monocytes à la formation des macrophages spumeux n'est pas encore établie, notamment par manque d'études épidémiologiques approfondies (71).

III. B. 1) b) Macrophages résidents ou MDM ?

Il est maintenant reconnu que la paroi artérielle saine possède de nombreux macrophages résidents (72–74), mais sont-ils à l'origine des macrophages spumeux ? Cochain, et collaborateurs (75), ont réalisé une étude de séquençage ARN cellule par cellule (*single-cell RNA-seq*) sur les macrophages de la plaque. Dans cette étude, ils ont mis en évidence trois sous-populations de macrophages dans la plaque : les macrophages résidents, les macrophages pro-inflammatoires et des macrophages exprimant le marqueur Trem2 (*Triggered receptor expressed on myeloid cells 2*). Ces derniers possèdent également des gènes associés aux voies métaboliques lipidiques, à l'efflux de cholestérol et à la calcification, que les auteurs ont reconnu deux ans plus tard comme étant les macrophages spumeux (76). Dans ces études, il y a donc une distinction claire entre les macrophages résidents et les macrophages spumeux, ce qui serait en faveur d'une origine non-résidente, donc circulatoire, des macrophages spumeux.

III. B. 2) Discussion sur le phénotype des macrophages spumeux

Concernant le rôle des macrophages spumeux dans l'inflammation, plusieurs hypothèses sont émises dans la littérature. Certaines études montrent que les macrophages spumeux auraient plutôt un profil inflammatoire. En effet, la liaison des LDLox au CD36 entraîne différentes cascades de signalisation pro-inflammatoires menant toutes à l'activation du facteur Nf-κB induisant la sécrétion d'IL-1β (57,61,77–80). De plus, l'altération du processus d'efflux du cholestérol (63) et l'accumulation de cholestérol qui en résulte rend les macrophages spumeux inflammatoires (81,82). En revanche, d'autres études montrent que les macrophages spumeux auraient un profil non inflammatoire. L'accumulation de desmosterol (un intermédiaire dans la synthèse du cholestérol et agoniste du LXR) engendre une diminution de l'expression de gènes pro-inflammatoires (83). De plus, de nombreuses études récentes travaillant sur le séquençage ARN sur cellules uniques ont mis en évidence que la population de macrophages spumeux n'exprime pas de gènes inflammatoires, et est bien distincte de la population inflammatoire. En 2019, Lin, *et al* ont étudié les monocytes et macrophages murins par la technique de séquençage ARN sur cellules uniques. Ils ont ainsi mis en évidence de nombreux clusters, dont les Trem2+ (équivalents à ceux de Cochain, *et al)*. De leurs études, ils ont pu différencier les macrophages spumeux (Trem2+) des macrophages possédant des gènes pro-inflammatoires et des macrophages résidents (84). De même, pour reprendre les études de Zernecke, *et al*, les auteurs distinguent les macrophages spumeux Trem2 des macrophages résidents mais également des macrophages inflammatoires (76). Une autre étude récente (Kim, *et al* 2018) s'est basée sur des résultats de séquençage ARN sur cellules uniques provenant d'aortes de souris, et triées par cytométrie en flux (85). Les macrophages qu'ils considèrent comme spumeux sont caractérisés par un fort

marquage au BODIPY (marqueur spécifique des lipides) et par une forte granularité (SSC high). Ils ont également mis en évidence que leurs macrophages spumeux montraient une diminution des gènes inflammatoires et une augmentation des gènes reliés à la gestion du cholestérol (internalisation, métabolisme et efflux) par rapport aux macrophages non spumeux. Ils en déduisent que ce ne sont pas les macrophages spumeux responsables de l'inflammation dans les plaques (Figure 13).

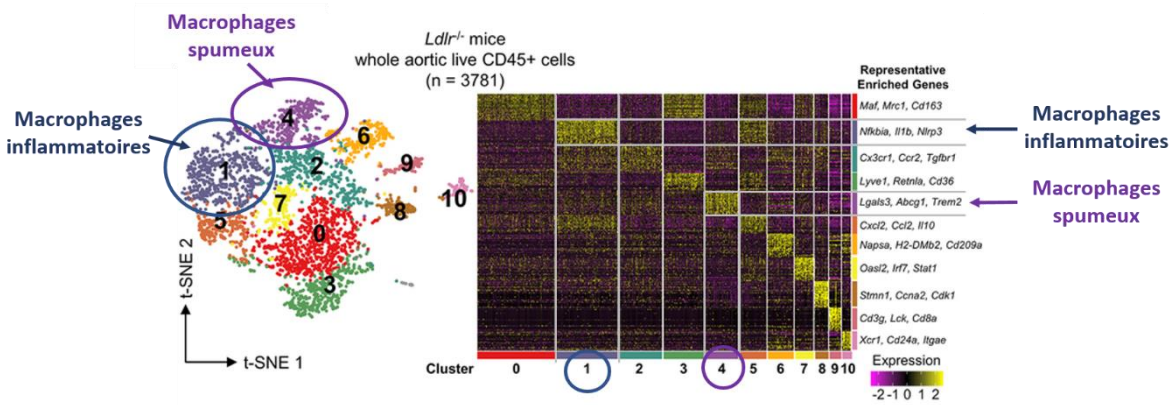


Figure 13 : Distinction fonctionnelle macrophages spumeux et inflammatoires. Issu de Kim, et al, Circ Res. 2018.

Finalement, les résultats de toutes ces études par séquençage ARN sur cellules uniques coïncident : les macrophages spumeux font partie d'une population de macrophages distincte des macrophages résidents et des macrophages pro-inflammatoires. Ils expriment des gènes qui leur sont propres (impliqués dans la gestion des lipides et dans la calcification) et n'expriment pas les gènes inflammatoires. Ces études sont pertinentes dans le sens où elles ne se basent plus sur des modèles cellulaires mais directement sur les cellules provenant des plaques d'athérome. Cependant toutes ces études ont été réalisées chez la souris, il serait donc intéressant d'appliquer ces recherches chez l'Homme en étudiant les cellules provenant de plaques humaines. Des chercheurs ont étudié les cellules provenant de plaques d'athérome de patients symptomatiques ou non, démontrant un enrichissement en lymphocytes T et en macrophages dans les plaques, plus particulièrement dans les plaques des patients asymptomatiques avec un profil inflammatoire (86). Ils ont isolé 15 Metaclusters, parmi lesquels les n°1 et 4 représentent les macrophages (respectivement $CD206^{high}/CD163^{high}$ et $CD206^{low}/CD163^{low}$), soit environ 17% des cellules totales (Figure 14). Cependant ils n'ont pas mis en évidence, dans cette étude, de cluster représentant les macrophages spumeux.

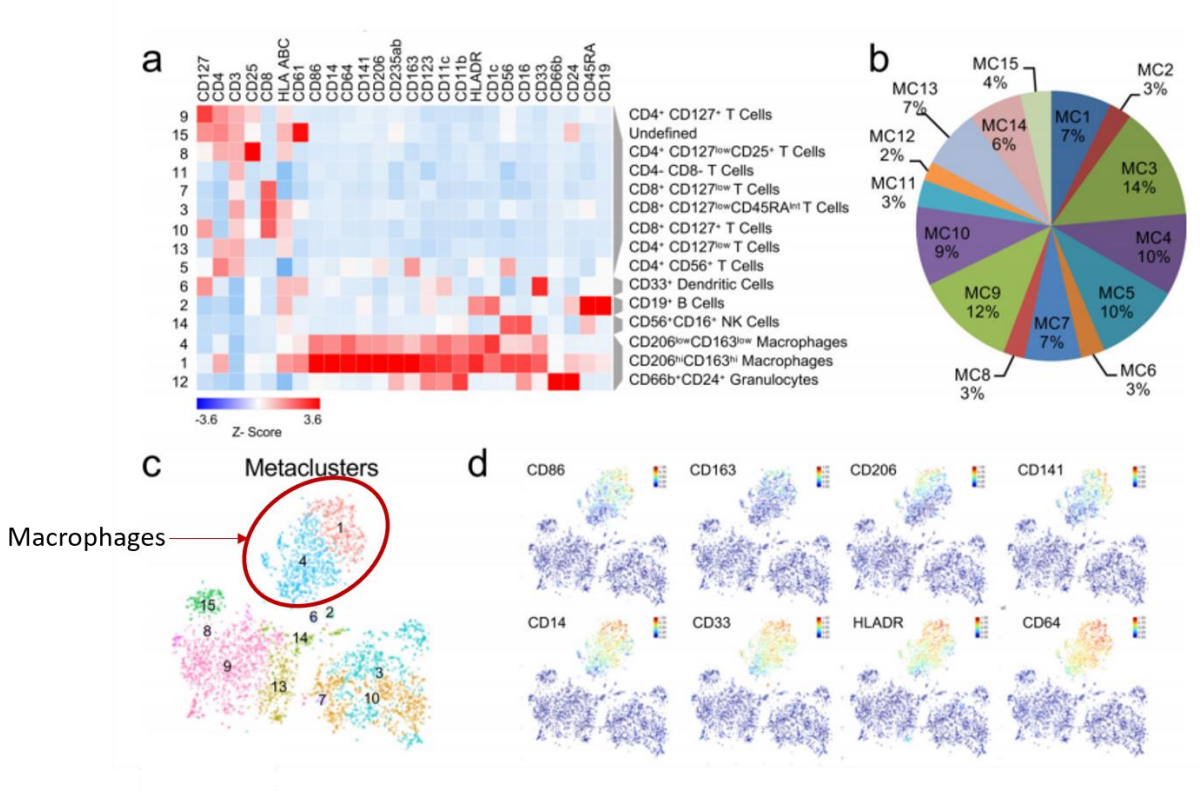


Figure 14 : Représentation des clusters étudiés chez l'Homme par Fernandez et al. Nat. Med. 2019.

Même si les macrophages spumeux ne semblent pas avoir un profil inflammatoire au vu de ces techniques, ils n'en restent pas moins reliés avec la progression des plaques vers la vulnérabilité car leur apoptose accélère la vulnérabilité des plaques (87). Etant donné que leur apoptose est induite par la perte de leur processus d'efflux du cholestérol, une approche thérapeutique restaurant cette fonction permettrait de rétablir des macrophages spumeux fonctionnels et ainsi éliminer les lipides de la plaque et diminuer le cœur nécrotique et l'inflammation. Cependant, cette approche nécessite une caractérisation plus approfondie des macrophages spumeux, de leur phénotype et de leurs fonctions en lien avec la prise en charge des lipides, notamment chez l'Homme. Un lien étroit étant établi entre la fonction des cellules immunitaires et leur métabolisme énergétique, nous nous sommes intéressées au métabolisme des macrophages spumeux en les comparant aux modèles de macrophages inflammatoires et immunorégulateurs.

Références :

1. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. Nat Rev Immunol. 2013 Oct;13(10):709–21.

2. Metchnikoff E. Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation faites à l'Institut Pasteur en avril et mai 1891. Paris: G. Masson Libraire de l'academie de Medecine, 1892

3. Ehrlich P. Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. Z. Klin. Med. 1880; 1: 553-560

4. Gordon S. Elie Metchnikoff, the Man and the Myth. J Innate Immun. 2016 Apr;8(3):223–7.

5. Pappenheim A. Ferrata A. Uber die verschiedenen lymphoiden Zellformen des normalen und pathologischen Blutes. Folia Haematol. (Frankf.). 1910; 10: 72-208

6. Ebert R.H. Florey H.W. The extravascular development of the monocyte observed in vivo. Br. J. Exp. Pathol. 1939; 20: 342-356

7. R van F, Za C. The Origin and Kinetics of Mononuclear Phagocytes. Vol. 128, The Journal of experimental medicine. J Exp Med; 1968.

8. Leder L-D. The origin of blood monocytes and macrophages. Blut. 1967 Nov 1;16(2):86–98.

9. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. Science. 2009 Jul 31;325(5940):612–6.

10. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nat Rev Immunol. 2011 Oct 10;11(11):762–74.

11. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood. 2010 Oct 21;116(16):e74-80.

12. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. Immunity. 2018 Oct 16;49(4):595–613.

13. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. J Exp Med. 2017 Jul 3;214(7):1913–23.

14. Tallone T, Turconi G, Soldati G, Pedrazzini G, Moccetti T, Vassalli G. Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. J Cardiovasc Transl Res. 2011 Apr;4(2):211–9.

15. Schmidl C, Renner K, Peter K, Eder R, Lassmann T, Balwierz PJ, et al. Transcription and enhancer profiling in human monocyte subsets. Blood. 2014 Apr 24;123(17):e90-99.

16. Idzkowska E, Eljaszewicz A, Miklasz P, Musial WJ, Tycinska AM, Moniuszko M. The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. Scand J Immunol. 2015;82(3):163–73.

17. Landsman L, Bar-On L, Zernecke A, Kim K-W, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. Blood. 2009 Jan 22;113(4):963–72.

18. Lee M, Lee Y, Song J, Lee J, Chang S-Y. Tissue-specific Role of CX3CR1 Expressing Immune Cells and Their Relationships with Human Disease. Immune Netw. 2018 Feb;18(1).

19. González P, Alvarez R, Batalla A, Reguero JR, Alvarez V, Astudillo A, et al. Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infarction. Genes Immun. 2001 Jun;2(4):191–5.

20. Muntinghe FLH, Verduijn M, Zuurman MW, Grootendorst DC, Carrero JJ, Qureshi AR, et al. CCR5 Deletion Protects Against Inflammation-Associated Mortality in Dialysis Patients. J Am Soc Nephrol JASN. 2009 Jul;20(7):1641–9.

21. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, et al. CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. J Am Coll Cardiol. 2012 Oct 16;60(16):1512–20.

22. Wildgruber M, Aschenbrenner T, Wendorff H, Czubba M, Glinzer A, Haller B, et al. The “Intermediate” CD14++CD16+ monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans. Sci Rep. 2016 19;6:39483.

23. Foster GA, Gower RM, Stanhope KL, Havel PJ, Simon SI, Armstrong EJ. On-chip phenotypic analysis of inflammatory monocytes in atherogenesis and myocardial infarction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug 20;110(34):13944–9.

24. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. Science. 2012 Apr 6;336(6077):86–90.

25. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. Immunity. 2013 Apr 18;38(4):792–804.

26. Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. Nat Rev Immunol. 2018;18(4):225–42.

27. Kaplan DH. Ontogeny and function of murine epidermal Langerhans cells. Nat Immunol. 2017 Sep 19;18(10):1068–75.

28. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, Cuda CM, Walter JM, McQuattie-Pimentel AC, et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. J Exp Med. 2017 Aug 7;214(8):2387–404.

29. Shaw TN, Houston SA, Wemyss K, Bridgeman HM, Barbera TA, Zangerle-Murray T, et al. Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. J Exp Med. 2018 04;215(6):1507–18.

30. Molawi K, Wolf Y, Kandalla PK, Favret J, Hagemeyer N, Frenzel K, et al. Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. J Exp Med. 2014 Oct 20;211(11):2151–8.

31. Bajpai G, Schneider C, Wong N, Bredemeyer A, Hulsmans M, Nahrendorf M, et al. The Human Heart Contains Distinct Macrophage Subsets with Divergent Origins and Functions. Nat Med. 2018 Aug;24(8):1234–45.

32. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol. 2008 Dec;8(12):958–69.

33. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal for phagocytic clearance. Nature. 2009 Sep 10;461(7261):282–6.

34. Kawano M, Nagata S. Efferocytosis and autoimmune disease. Int Immunol. 2018 Aug 24;30(12):551–8.

35. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. Nature. 2002 May 9;417(6885):182–7.

36. Tsou W-I, Nguyen K-QN, Calarese DA, Garforth SJ, Antes AL, Smirnov SV, et al. Receptor Tyrosine Kinases, TYRO3, AXL, and MER, Demonstrate Distinct Patterns and Complex Regulation of Ligand-induced Activation. J Biol Chem. 2014 Sep 12;289(37):25750–63.

37. Wong K, Valdez PA, Tan C, Yeh S, Hongo J-A, Ouyang W. Phosphatidylserine receptor Tim-4 is essential for the maintenance of the homeostatic state of resident peritoneal macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 May 11;107(19):8712–7.

38. Trinh MN, Brown MS, Goldstein JL, Han J, Vale G, McDonald JG, et al. Last step in the path of LDL cholesterol from lysosome to plasma membrane to ER is governed by phosphatidylserine. Proc Natl Acad Sci. 2020 Aug 4;117(31):18521–9.

39. Soppert J, Lehrke M, Marx N, Jankowski J, Noels H. Lipoproteins and lipids in cardiovascular disease: from mechanistic insights to therapeutic targeting. Adv Drug Deliv Rev. 2020 Jul 27;

40. Mineo C. Lipoprotein receptor signalling in atherosclerosis. Cardiovasc Res. 2020 Jun 1;116(7):1254–74.

41. Wynn TA, Barron L. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. Semin Liver Dis. 2010 Aug;30(3):245–57.

42. Poltavets AS, Vishnyakova PA, Elchaninov AV, Sukhikh GT, Fatkhudinov TKh. Macrophage Modification Strategies for Efficient Cell Therapy. Cells. 2020 Jun 24;9(6).

43. Bellón T, Martínez V, Lucendo B, del Peso G, Castro MJ, Aroeira LS, et al. Alternative activation of macrophages in human peritoneum: implications for peritoneal fibrosis. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 2011 Sep;26(9):2995–3005.

44. Lavine KJ, Epelman S, Uchida K, Weber KJ, Nichols CG, Schilling JD, et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Nov 11;111(45):16029–34.

45. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. Immunity. 2014 Jan 16;40(1):91–104.

46. Honold L, Nahrendorf M. Resident and monocyte-derived macrophages in cardiovascular disease. Circ Res. 2018 Jan 5;122(1):113–27.

47. Swirski FK, Pittet MJ, Kircher MF, Aikawa E, Jaffer FA, Libby P, et al. Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jul 5;103(27):10340–5.

48. Williams JW, Zaitsev K, Kim K-W, Ivanov S, Saunders BT, Schrank PR, et al. Limited proliferation capacity of aortic intima resident macrophages requires monocyte recruitment for atherosclerotic plaque progression. Nat Immunol. 2020 Sep 7;

49. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. J Immunol Baltim Md 1950. 2000 Jun 15;164(12):6166–73.

50. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. 2004 Dec;25(12):677–86.

51. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. Front Biosci J Virtual Libr. 2008 Jan 1;13:453–61.

52. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Changes in transcriptome of macrophages in atherosclerosis. J Cell Mol Med. 2015 Jun;19(6):1163–73.

53. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity. 2014 Jul 17;41(1):14–20.

54. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. Nat Med. 2011 Nov 7;17(11):1410–22.

55. Bondareva O, Sheikh BN. Vascular Homeostasis and Inflammation in Health and Disease-Lessons from Single Cell Technologies. Int J Mol Sci. 2020 Jun 30;21(13).

56. Stöger JL, Gijbels MJJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EAL, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. Atherosclerosis. 2012 Dec;225(2):461–8.

57. Peled M, Fisher EA. Dynamic Aspects of Macrophage Polarization during Atherosclerosis Progression and Regression. Front Immunol. 2014 Nov 12;5.

58. Finn AV, Nakano M, Polavarapu R, Karmali V, Saeed O, Zhao X, et al. Hemoglobin Directs Macrophage Differentiation and Prevents Foam Cell Formation in Human Atherosclerotic Plaques. J Am Coll Cardiol. 2012 Jan 10;59(2):166–77.

59. Bäck M, Yurdagul A, Tabas I, Öörni K, Kovanen PT. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. Nat Rev Cardiol. 2019;16(7):389–406.

60. Frégeau G, Sarduy R, Elimam H, Esposito CL, Mellal K, Ménard L, et al. Atheroprotective and atheroregressive potential of azapeptide derivatives of GHRP-6 as selective CD36 ligands in apolipoprotein E-deficient mice. Atherosclerosis. 2020 Aug;307:52–62.

61. Nguyen MT, Fernando S, Schwarz N, Tan JT, Bursill CA, Psaltis PJ. Inflammation as a Therapeutic Target in Atherosclerosis. J Clin Med. 2019 Jul 26;8(8).

62. Barrett TJ. Macrophages in Atherosclerosis Regression. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020 Jan;40(1):20–33.

63. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. J Am Coll Cardiol. 2006 Apr 18;47(8 Suppl):C7-12.

64. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. Cell. 2011 Apr 29;145(3):341–55.

65. Lee J, Choi J-H. Deciphering Macrophage Phenotypes upon Lipid Uptake and Atherosclerosis. Immune Netw. 2020 Jun 22;20(3).

66. Luo Y, Duan H, Qian Y, Feng L, Wu Z, Wang F, et al. Macrophagic CD146 promotes foam cell formation and retention during atherosclerosis. Cell Res. 2017 Mar;27(3):352–72.

67. van Gils JM, Derby MC, Fernandes LR, Ramkhelawon B, Ray TD, Rayner KJ, et al. The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. Nat Immunol. 2012 Jan 8;13(2):136–43.

68. Feig JE, Shang Y, Rotllan N, Vengrenyuk Y, Wu C, Shamir R, et al. Statins promote the regression of atherosclerosis via activation of the CCR7-dependent emigration pathway in macrophages. PloS One. 2011;6(12):e28534.

69. Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L, Bryngelsson C, Hedblad B, Fredrikson GN, et al. Elevated CD14++CD16- monocytes predict cardiovascular events. Circ Cardiovasc Genet. 2012 Feb 1;5(1):122–31.

70. Meeuwsen JAL, de Vries JJ, van Duijvenvoorde A, van der Velden S, van der Laan SW, van Koeverden ID, et al. Circulating CD14+CD16- classical monocytes do not associate with a vulnerable plaque phenotype, and do not predict secondary events in severe atherosclerotic patients. J Mol Cell Cardiol. 2019;127:260–9.

71. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. Front Immunol. 2019 Aug 30;10.

72. Davies LC, Rosas M, Smith PJ, Fraser DJ, Jones SA, Taylor PR. A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. Eur J Immunol. 2011;41(8):2155–64.

73. Gordon S, Plüddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. BMC Biol. 2017 Jun 29;15.

74. Willemsen L, de Winther MP. Macrophage subsets in atherosclerosis as defined by single-cell technologies. J Pathol. 2020 Jan 31;

75. Cochain Clément, Vafadarnejad Ehsan, Arampatzi Panagiota, Pelisek Jaroslav, Winkels Holger, Ley Klaus, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis. Circ Res. 2018 Jun 8;122(12):1661–74.

76. Zernecke A, Winkels H, Cochain C, Williams JW, Wolf D, Soehnlein O, et al. Meta-Analysis of Leukocyte Diversity in Atherosclerotic Mouse Aortas. Circ Res. 2020 Jul 17;127(3):402–26.

77. Chistiakov DA, Myasoedova VA, Revin VV, Orekhov AN, Bobryshev YV. The phenomenon of atherosclerosis reversal and regression: Lessons from animal models. Exp Mol Pathol. 2017;102(1):138–45.

78. Miller YI, Choi S-H, Wiesner P, Fang L, Harkewicz R, Hartvigsen K, et al. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. Circ Res. 2011 Jan 21;108(2):235–48.

79. van Tits LJH, Stienstra R, van Lent PL, Netea MG, Joosten LAB, Stalenhoef AFH. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: A crucial role for Krüppel-like factor 2. Atherosclerosis. 2011 Feb 1;214(2):345–9.

80. Jiang Y, Wang M, Huang K, Zhang Z, Shao N, Zhang Y, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces secretion of interleukin-1β by macrophages via reactive oxygen species-dependent NLRP3 inflammasome activation. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Aug 24;425(2):121–6.

81. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. Nature. 2010 Apr 29;464(7293):1357–61.

82. Westerterp M, Bochem AE, Yvan-Charvet L, Murphy AJ, Wang N, Tall AR. ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation. Circ Res. 2014 Jan 3;114(1):157–70.

83. Spann NJ, Garmire LX, McDonald JG, Myers DS, Milne SB, Shibata N, et al. Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. Cell. 2012 Sep 28;151(1):138–52.

84. Lin J-D, Nishi H, Poles J, Niu X, Mccauley C, Rahman K, et al. Single-cell analysis of fate-mapped macrophages reveals heterogeneity, including stem-like properties, during atherosclerosis progression and regression. JCI Insight. 4(4).

85. Kim K, Shim D, Lee JS, Zaitsev K, Williams JW, Kim K-W, et al. Transcriptome Analysis Reveals Non-Foamy Rather than Foamy Plaque Macrophages Are Pro-Inflammatory in Atherosclerotic Murine Models. Circ Res. 2018 Oct 26;123(10):1127–42.

86. Fernandez DM, Rahman AH, Fernandez N, Chudnovskiy A, Amir ED, Amadori L, et al. Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques. Nat Med. 2019 Oct;25(10):1576–88.

87. Canfrán-Duque A, Rotllan N, Zhang X, Fernández-Fuertes M, Ramírez-Hidalgo C, Araldi E, et al. Macrophage deficiency of miR-21 promotes apoptosis, plaque necrosis, and vascular inflammation during atherogenesis. EMBO Mol Med. 2017 Sep;9(9):1244–62.

Chapitre III : Métabolisme et macrophages

La caractérisation fonctionnelle des cellules par l'étude du métabolisme énergétique est une alternative à leur caractérisation phénotypique par leurs marqueurs de surface ou par les ARN transcrits. L'avantage majeur de cette technique est que le métabolisme est observable seulement sur les cellules vivantes, il n'y a alors pas de risque d'étudier des cellules mortes, comme cela peut arriver en immunohistochimie où les marqueurs de surface peuvent être présents sur des débris cellulaires. Le métabolisme cellulaire appliqué aux cellules immunitaires se nomme « immunométabolisme ». L'étude du métabolisme des cellules immunes a débuté il y a 50 ans (1,2), mais ce n'est vraiment qu'au cours de ces dix dernières années qu'un lien complexe entre la fonction des cellules immunitaires et la reprogrammation métabolique a été démontré (3).

I. Principes du métabolisme et substrats énergétiques

I. A. Métabolisme énergétique

Le métabolisme est l'ensemble des réactions biochimiques permettant aux cellules de fabriquer leur énergie. Cette énergie leur est nécessaire pour se multiplier, produire des protéines, se déplacer, et interagir avec les autres cellules. Le métabolisme peut être catabolique, c'est la dégradation de molécules, par exemple pour en tirer de l'énergie (métabolisme énergétique), ou il peut être anabolique, c'est la fabrication de molécules, par exemple la production de protéines ou d'acides gras. La plupart de ces réactions se déroulent dans le cytosol cellulaire, comme par exemple la glycolyse, la synthèse des acides gras, le métabolisme des acides aminés mais certaines ont lieu dans les organelles telles que les mitochondries, le réticulum endoplasmique et les péroxysomes. L'organelle principale reliée au métabolisme énergétique est la mitochondrie. Elle est constituée d'une double membrane entourant un espace intermembranaire, et de ribosomes pour la synthèse de leurs propres protéines. Les mitochondries sont donc relativement autonomes, c'est pourquoi on pense qu'elles dérivent d'une bactérie qui aurait été endocytée par une plus grosse cellule, et qui aurait évolué en symbiose avec celle-ci. Les mitochondries sont considérées comme les usines énergétiques de la cellule car elles accueillent des réactions importantes du métabolisme : la dégradation des acides gras, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire aboutissant à la synthèse d'ATP.

I. B. Produits et substrats

I. B. 1) ATP

L'ATP, ou Adénosine 5'-triphosphate, est formé d'une base nucléique (l'adénine), d'un sucre (le ribose) et de trois groupements phosphate (Figure 15). Ces derniers contiennent des liaisons riches en énergie, et lorsque les enzymes cellulaires des voies métaboliques les hydrolysent, de l'énergie est libérée permettant de synthétiser d'autres molécules.

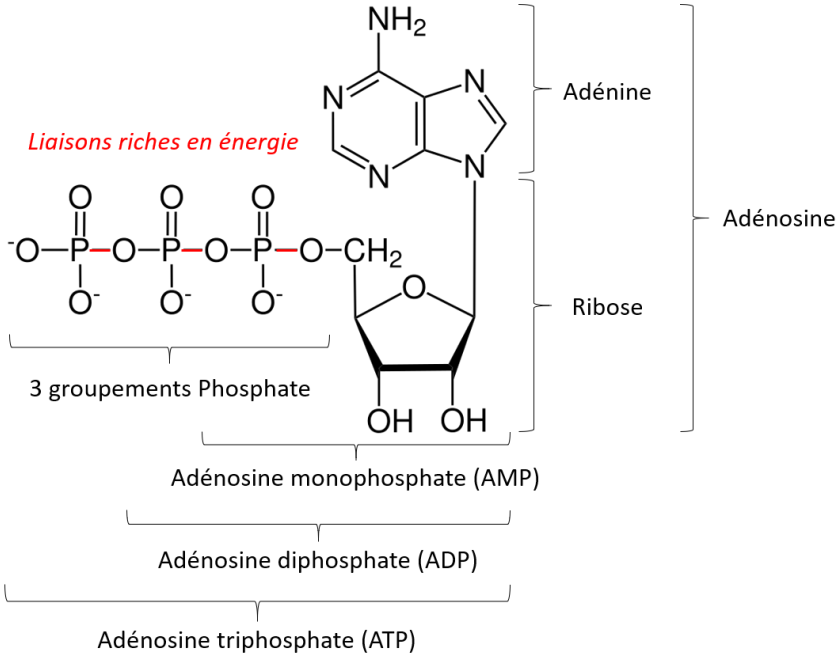


Figure 15 : Structure de l'ATP

L'ATP peut être synthétisé à partir de différents substrats (glucose, acides gras), suivant leur disponibilité dans l'environnement et/ou de la fonction que doit accomplir la cellule.

I. B. 2) Glucose

Le glucose est un sucre, ou glucide, simple (monosaccharide) de formule brute $C_6H_{12}O_6$. Il est présent dans les glucides alimentaires, soit comme constituant unique dans l'amidon (forme de stockage du glucose chez les végétaux) ou dans le glycogène (forme de stockage du glucose chez les mammifères), soit combiné avec d'autres oses comme le fructose ou le galactose dans le saccharose et le lactose (Figure 16).

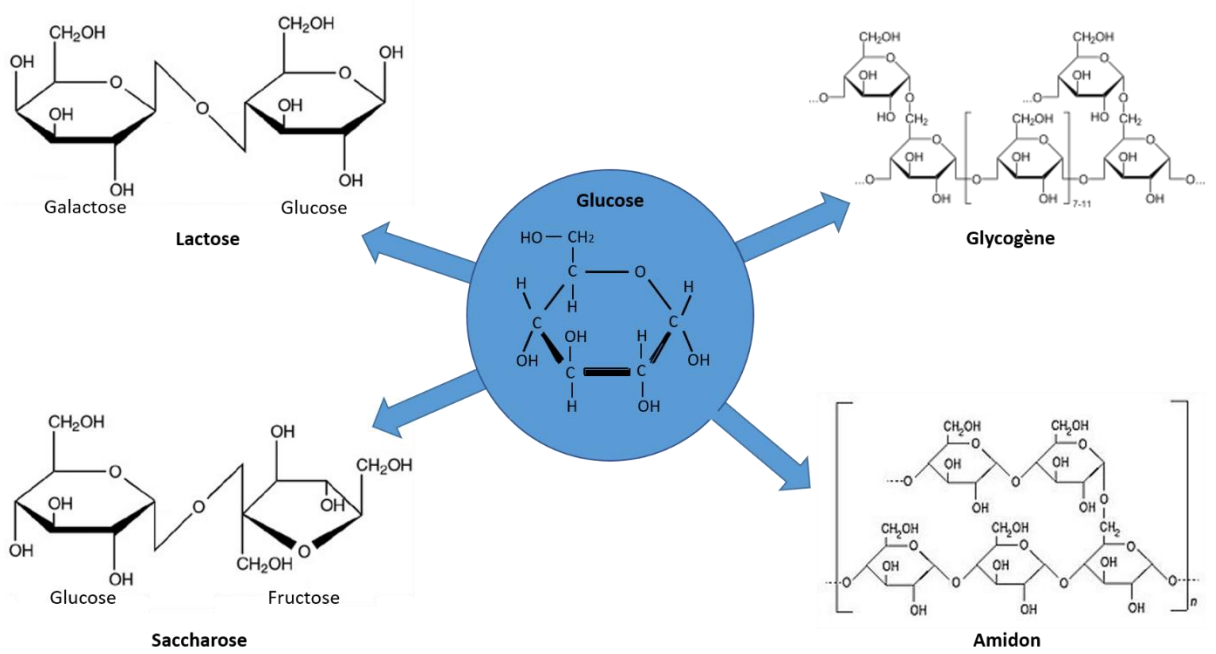


Figure 16 : Structure du glucose, et des oligosaccharides et polysaccharides

Ces sucres alimentaires commencent à être hydrolysés dès la mastication sous l'action d'une enzyme de la salive, l'amylase. Ils sont ensuite complètement hydrolysés dans l'intestin grâce aux hydrolases pancréatiques et au microbiote intestinal. Le glucose qui en découle traverse les entérocytes par des transporteurs spécifiques (GLUT2) et se retrouve dans la circulation sanguine. Le cerveau étant l'organe le plus énergivore, il va consommer 25% de ce glucose circulant, alors qu'il ne représente que 2% du poids du corps humain ! Le reste du glucose circulant est, soit consommé par les autres organes, soit stocké sous forme de glycogène (par l'action de l'insuline sécrétée après un repas) dans les cellules du foie et du tissu musculaire, et sous forme d'acides gras dans le tissu adipeux. Lorsque la glycémie est faible (le taux d'insuline également), la sécrétion de glucagon va induire, dans le foie, la dégradation de glycogène en glucose qui pourra être libéré dans la circulation sanguine afin de maintenir la glycémie, c'est la glycogénolyse. Le glycogène stocké dans les autres cellules (muscles, reins, testicules, …) ne pourra, quant à lui, servir qu'à un apport énergétique local de la cellule. La dégradation des lipides issus des cellules adipeuses pour obtenir du glucose est un mécanisme beaucoup plus long. La dégradation d'une molécule de glucose aboutit à la synthèse de 2 ATP via la glycolyse et 32 via le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire.

I. B. 3) Acides gras

Les acides gras sont constitués d'une chaîne carbonée de 4 à 36 atomes de carbone. On distingue deux types d'acides gras, les acides gras insaturés (une ou plusieurs doubles liaisons) et les acides gras saturés (aucune double liaison). Les acides gras insaturés sont dits « essentiels » car les mammifères ne sont pas capables de les fabriquer. Plus précisément, ce sont les acides polyinsaturés linoléiques (oméga6) et α-linoléniques (oméga3) qui sont indispensables et qui servent de précurseurs à d'autres acides gras des mêmes familles, eux-mêmes indispensables à certaines fonctions physiologiques. L'acide α-linolénique est le précurseur de la famille des Oméga3 qui ont un rôle anti-inflammatoire (protection des artères), anti-allergique et dans le maintien de l'intégrité des membranes des organes. L'acide α-linoléique est le précurseur de la famille des Oméga6 qui jouent un rôle dans l'inflammation, la vasomotricité et l'agrégation des plaquettes. Les acides gras monoinsaturés de la famille des Oméga9 sont dits « non essentiels » car ils peuvent être synthétisés. Ils sont en faveur d'une diminution des maladies cardiovasculaires car ils augmentent les HDL et diminuent les LDL, et ont des propriétés antioxydantes. Les acides gras saturés sont présents principalement dans les graisses animales et les produits industriels, et les acides gras insaturés dans les huiles végétales, les graines et les poissons gras (Figure 17).

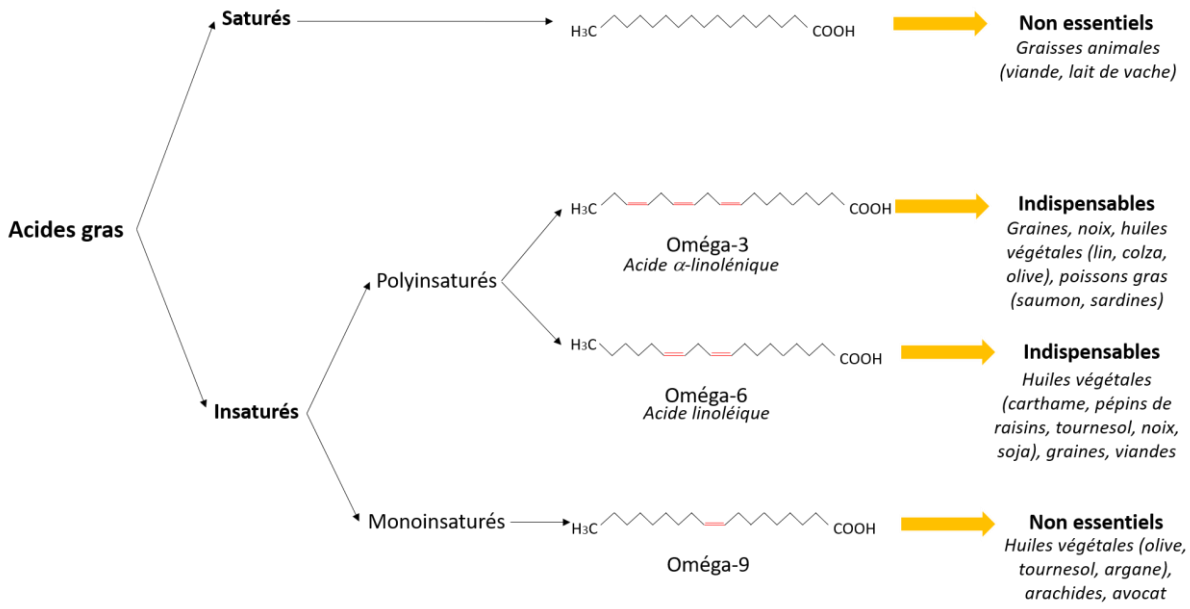


Figure 17 : Structure et provenance des acides gras

Les acides gras sont stockés sous forme de triglycérides (ou triacylglycérol) et sont une réserve énergétique importante. Leur dégradation produit de grandes quantités d'ATP, par exemple une molécule d'acide palmitique (n=16 atomes de carbone) permet la synthèse de 106 ATP.

I. B. 4) Acides aminés

Les acides aminés sont composés d'un acide carboxylique, d'un groupement amine et d'une chaîne latérale (R) qui varie entre les différents acides aminés (Figure 18).

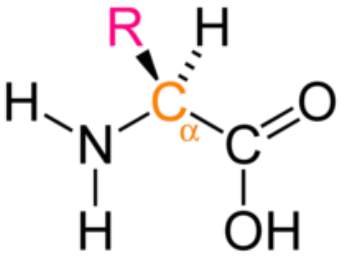


Figure 18 : Structure générale des acides aminés

Ils interviennent dans la constitution des protéines et peuvent également être dégradés pour produire de l'énergie et de nombreux précurseurs métaboliques à l'origine de glucides, lipides, et corps cétoniques. Neuf acides aminés sont dits « essentiels », car ils ne peuvent pas être synthétisés et doivent être apportés par l'alimentation : phénylalanine, thréonine, méthionine, lysine, tryptophane, leucine, isoleucine, valine et histidine. Les onze autres (tyrosine, aspartate, asparagine, alanine, sérine, glycine, cystéine, glutamate, glutamine, proline et arginine) peuvent être synthétisés.

I. B. 5) Intermédiaires du métabolisme transporteurs d'électrons

Les intermédiaires du métabolisme responsables de l'apport ou de la récupération d'électrons dans les réactions biochimiques sont le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et la flavine adénine dinucléotide (FAD).

Le **NAD** dérive de la vitamine niacine et est constitué de deux nucléotides : le premier dont la base est l'adénine et le second dont la base est le nicotinamide. Le NAD existe sous la forme oxydée (NAD^+) et sous la forme réduite (NADH) (Figure 19).

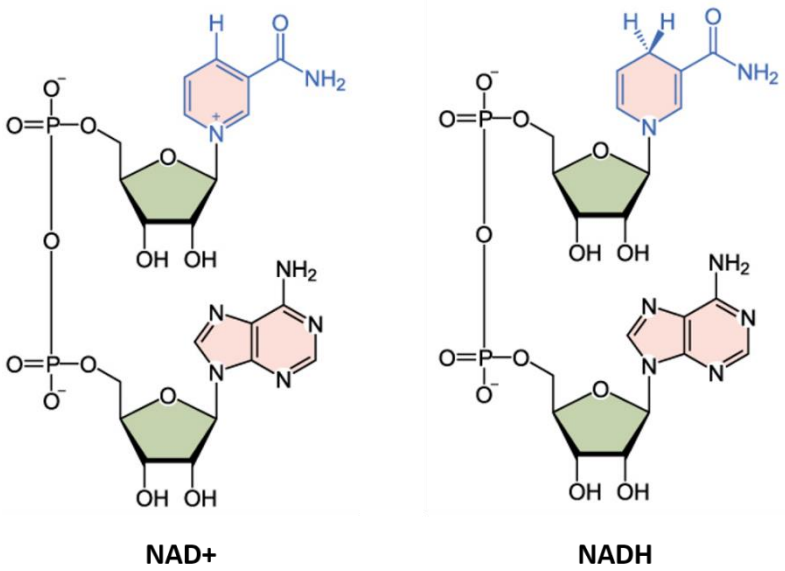


Figure 19 : Structure du NAD+ et du NADH

Le NADH a la particularité d'absorber la lumière dans l'ultraviolet (pic d'absorption à 339nm) et d'émettre de la fluorescence autour de 460nm. Le NAD n'émet pas de fluorescence.

Le **FAD** dérive de la vitamine riboflavine et est, lui aussi, constitué de deux nucléotides : le premier dont la base est l'adénine et le second dont la base est la flavine. Le FAD existe sous la forme oxydée (FAD) et sous la forme réduite ($FADH_2$) (Figure 20).

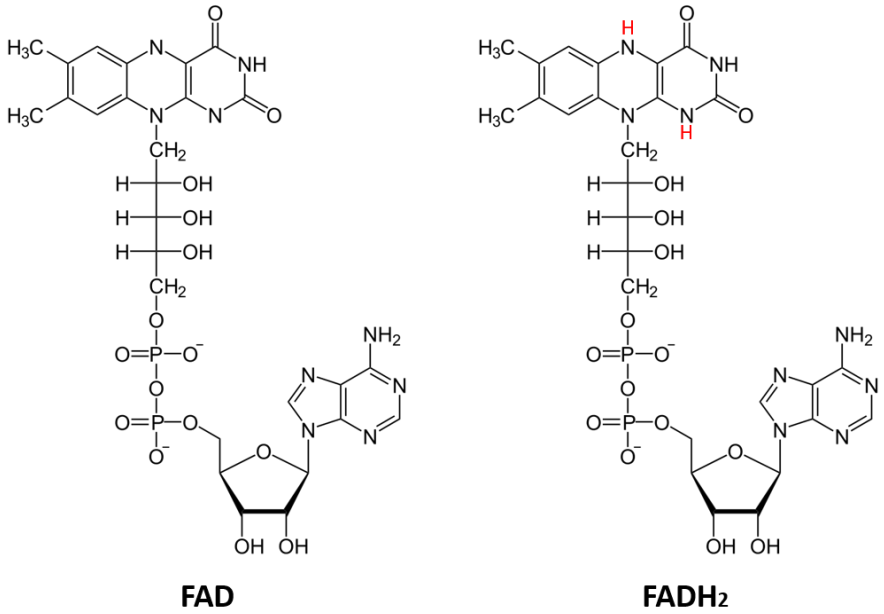


Figure 20 : Structure du FAD et FADH2

Le FAD est également fluorescent, son pic d'absorption est à 450nm et son émission entre 515-520nm. Le $FADH_2$ n'est pas fluorescent.

II. Voies du métabolisme énergétique

II. A. Glycolyse

La glycolyse, ou voie métabolique glycolytique, correspond au catabolisme du glucose aboutissant à la production de pyruvate et d'ATP (Figure 21A), et a lieu dans le cytosol. L'enzyme régulatrice de la glycolyse est la phosphofructokinase-1 (PFK-1) qui est inhibée par une abondance d'ATP et de citrate. Même si la glycolyse est peu efficace au niveau énergétique, avec seulement deux molécules d'ATP produites par molécule de glucose, elle permet la synthèse de nombreux intermédiaires du métabolisme, tels que le glucose-6-phosphate (synthèse du ribose pour les nucléotides) et le pyruvate (pour la synthèse d'acides gras), et permet la réduction du NAD^+ et NADH, cofacteur de nombreuses enzymes. La glycolyse est induite par les voies de signalisation impliquant PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase)* et MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) qui induisent également la croissance cellulaire ; la glycolyse est la voie métabolique principalement utilisée par les cellules en prolifération (3). Lorsque la glycolyse n'est pas couplée au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire, la cellule va réduire le pyruvate en lactate et ainsi recycler le NADH en NAD^+, ce qui permet de maintenir le flux glycolytique pour la production d'ATP. Lorsque la glycolyse est utilisée en présence d'oxygène, on l'appelle glycolyse aérobie ou effet Warburg. Elle est principalement utilisée par les cellules inflammatoires et les cellules cancéreuses (et également dans le cerveau par les astrocytes (4)). La glycolyse anaérobie, elle, a généralement lieu lors d'une baisse d'oxygène, comme dans les cellules musculaires de type II (fibres blanches) lors d'efforts intenses, telles que des courses de sprint. Le lactate qui s'accumule sera retransformé en pyruvate puis en glucose dans le foie. Lorsque la glycolyse est couplée au cycle de Krebs, cela signifie que le pyruvate produit alimente celui-ci permettant ainsi de faire fonctionner la chaîne respiratoire.

II. B. Voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates (VPP) se déroule également dans le cytosol. Sa régulation se fait également via l'enzyme CARKL (*carbohydrate kinase-like protein*), dont l'activation inhibe la VPP. Elle est constituée de deux branches (Figure 21B), la branche oxydative qui régénère du NADPH (un intermédiaire réducteur nécessaire à l'environnement redox de la cellule) et aboutit à la synthèse de ribulose-5-phosphate, et la branche non oxydative qui convertit trois molécules de ribulose-5-phosphate en deux molécules de fructose-6-phosphate et une molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate qui sont réutilisées dans la glycolyse. Le fructose-6-phosphate peut alimenter la glycolyse vers la synthèse de pyruvate (si PFK-1 n'est pas inhibée) ou être retransformé en glucose-6-phosphate

par la phosphoglucose isomérase pour réalimenter la voie des pentoses phosphates. La VPP est activée afin de réduire le NAD^+ en NADPH, qui sera alors utilisé lors de la synthèse des acides gras et lors de la réduction du glutathion qui sert à protéger les cellules de dommages oxydatifs. L'érythrose-4-phosphate est un précurseur de la synthèse des acides nucléiques. Cette voie est donc, comme la glycolyse, principalement utilisée par les cellules en croissance et prolifératives (3).

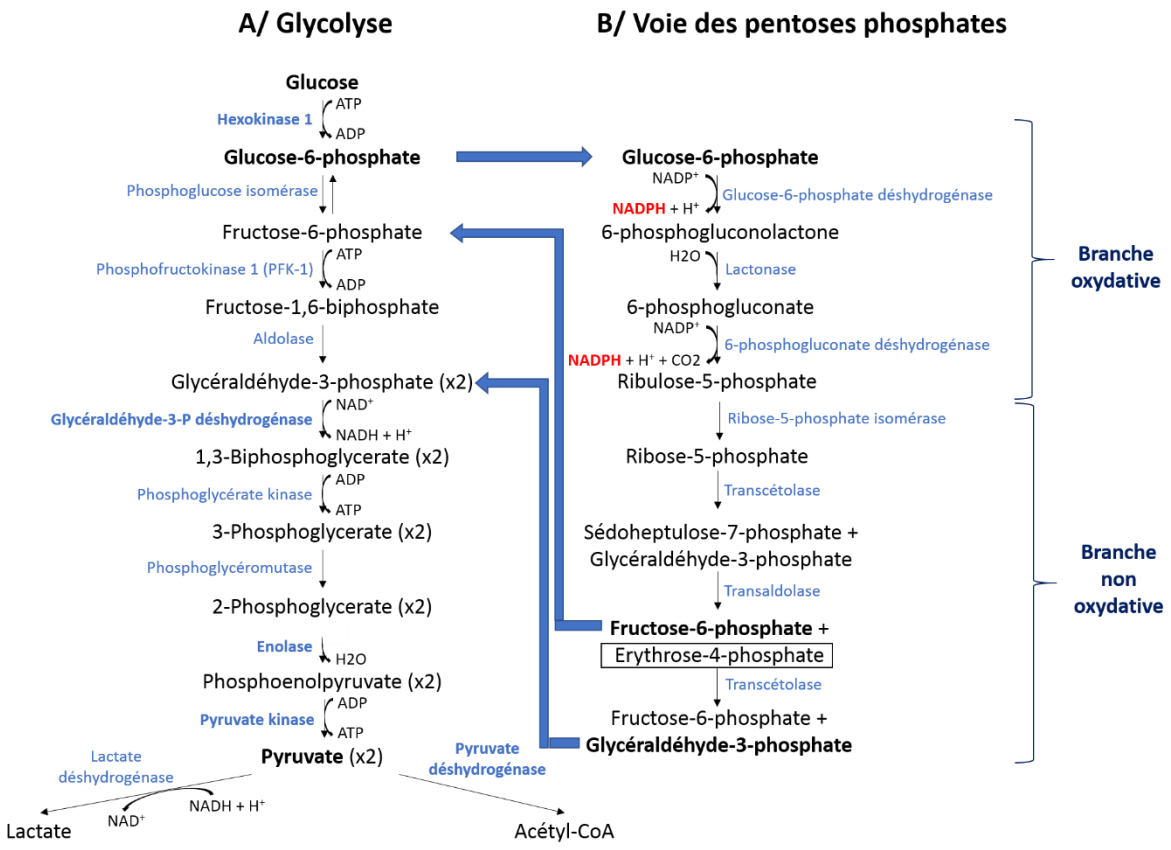


Figure 21 : Interactions entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Inspiré de Van den Bossche, et al, Trends in Immunolog. 2017.

II. C. β-oxydation des acides gras

La β-oxydation permet le clivage des acides gras en molécules qui seront transformées en énergie dans le cycle de Krebs et dans la chaîne respiratoire.

Les acides gras étant stockés sous forme de triacylglycérol dans les adipocytes, il faut les rendre disponibles. Pour cela, ce sont les hormones telles que l'adrénaline et la noradrénaline, libérées en cas de stress ou d'exercice, qui vont activer les enzymes adipose triacylglycérol lipase (ATGL) et hormone-sensitive lipase libérant ainsi trois molécules de palmitate et une molécule de glycérol à partir d'un triacylglycérol tripalmitine (Figure 22A). Sachant que les acides gras sont hydrophobes et toxiques pour la cellule, ils sont toujours véhiculés par l'albumine dans le sang et par la FABP (*fatty-acid binding*

protein) dans le cytosol. Le glycérol est à nouveau transformé en glucose dans les hépatocytes tandis que les acides gras (exemple donné pour le palmitate dans la Figure 22) sont transportés dans la circulation sanguine jusqu'aux cellules qui en ont besoin. Dans le cytosol, les molécules d'acide gras sont associées chacune à un acétyl-CoA et sont ensuite transportées à travers la membrane mitochondriale via la navette des carnitine palmitoyl transférases (CPT). CPT1 associe un acyl-CoA à une molécule de carnitine pour lui faire traverser la membrane, puis CPT2 enlève la molécule de carnitine pour que l'acyl-CoA soit relargué dans la matrice mitochondriale. Les acides gras à courte chaîne carbonée (n<14C) n'ont pas besoin de la navette CPT1/CPT2, ils diffusent simplement à travers les membranes mitochondriales. Au niveau de la matrice mitochondriale, les systèmes de boucles de la β-oxydation vont oxyder et cliver l'acyl-CoA, libérant, pour le palmitoyl-CoA par exemple, 8 acétyl-CoA, 7 molécules de $FADH_2$ et 7 molécules de NADH (Figure 22B).

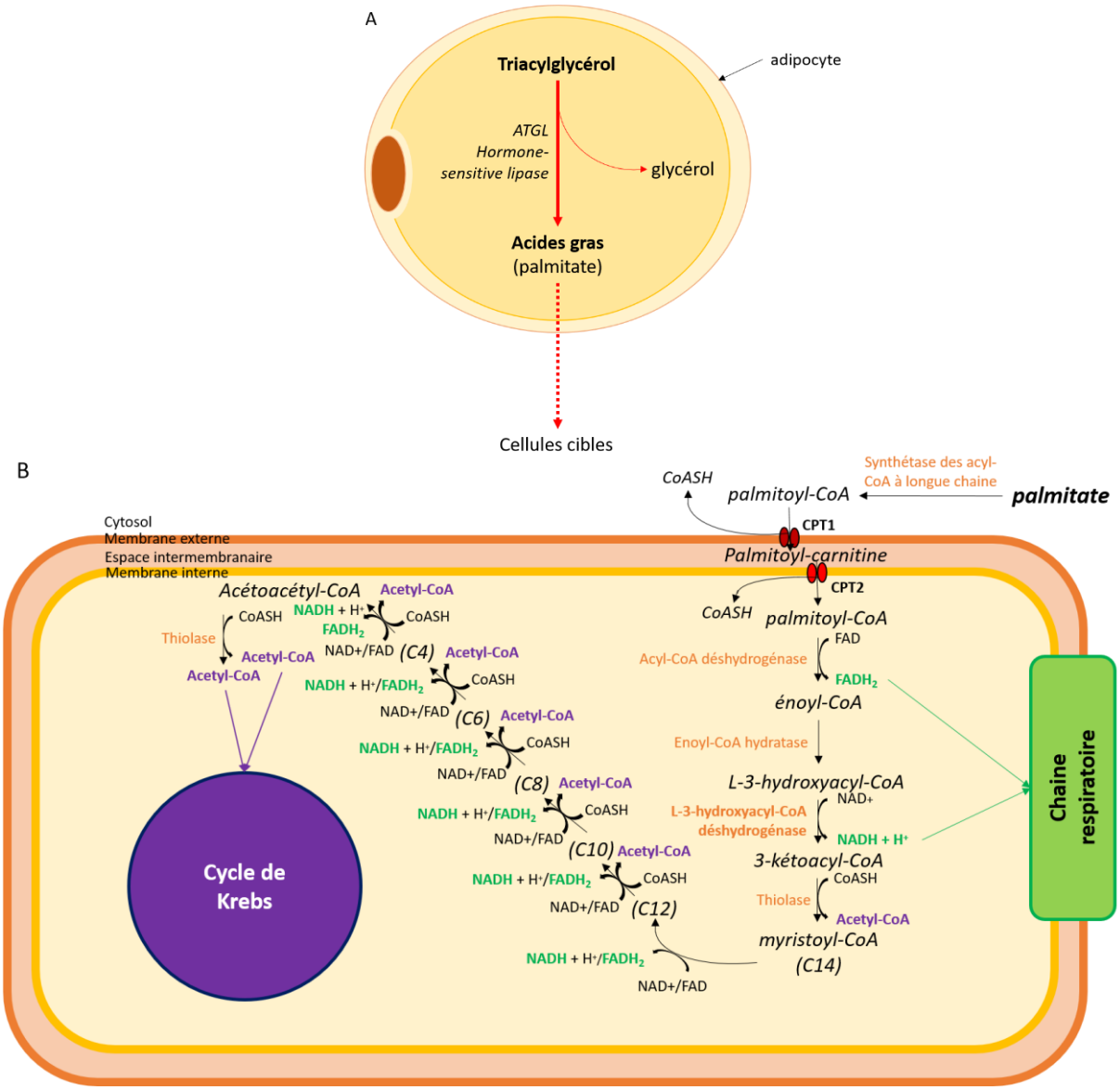


Figure 22 : Libération d'acides gras à partir de triacylglycérol et β-oxydation des acides gras. Inspiré de J. G. Salway. Metabolism at a glance. Fourth edition, Wiley & Sons Inc., 2017

Les acétyl-CoA vont ensuite être pris en charge dans le cycle de Krebs (Figure 23) tandis que les NADH et $FADH_2$ vont être oxydés dans la chaîne respiratoire (Figure 24).

II. D. Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, aussi appelé cycle de l'acide citrique et cycle TCA (cycle de l'acide tricarboxylique), a lieu au sein des mitochondries. Il utilise l'acétyl-CoA dérivé des carbohydrates, corps cétoniques, acides gras et certains acides aminés, pour produire les intermédiaires NADH et $FADH_2$, qui serviront ensuite à la synthèse de l'ATP dans la chaîne respiratoire. Le cycle de Krebs en lui-même ne produit qu'un équivalent ATP (GTP) ; c'est son association avec la chaîne respiratoire qui augmente fortement son rendement énergétique. Il fournit de nombreuses molécules de NADH qui seront prises en charge par le complexe I de la chaîne respiratoire, ainsi que des molécules de $FADH_2$ qui seront prises en charge par le complexe II. A noter que l'enzyme succinate déshydrogénase permettant de transformer le succinate en fumarate correspond au complexe II de la chaîne respiratoire et la malate déshydrogénase permettant de transformer le malate en oxaloacétate correspond au complexe I (Figure 23).

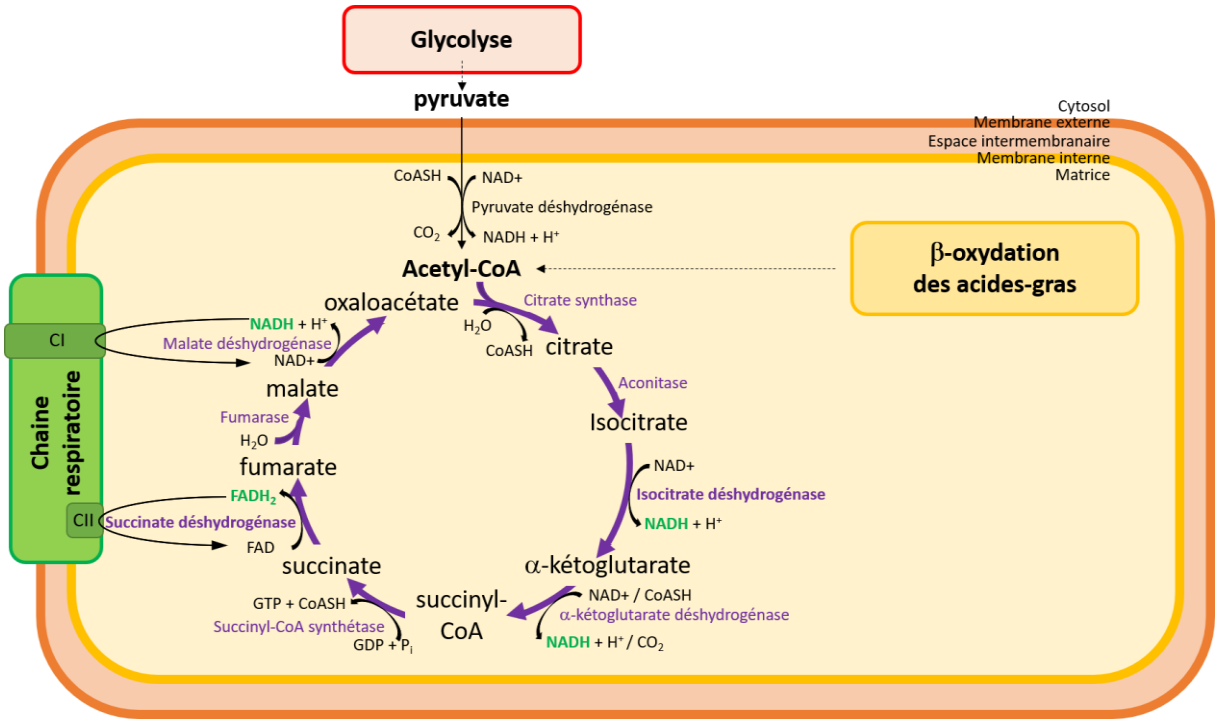


Figure 23 : Cycle de Krebs. Inspiré de J. G. Salway. Metabolism at a glance. Fourth edition, Wiley & Sons Inc., 2017

II. E. Chaîne respiratoire, synthèse d'ATP et stress oxydant

La chaîne respiratoire mitochondriale se situe au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Elle consiste en une série de complexes (I à IV) accueillant des réactions d'oxydo-réductions. Le but de ces complexes est de réaliser un gradient de protons entre chaque côté de la membrane interne afin de faire fonctionner l'ATP synthase. Ce gradient de protons est obtenu grâce à deux processus couplés au sein des complexes : le transport d'électrons et la phosphorylation oxydative. Les électrons proviennent de l'oxydation du NADH et du $FADH_2$ et sont transportés, soit avec des protons sur l'ubiquinone (qui devient l'ubiquinol une fois réduite) entre les complexes CI, CII et CIII, soit seuls sur le cytochrome c entre les complexes CIII et CIV. Les complexes I, III et IV pompent les protons de la matrice mitochondriale pour les libérer dans l'espace intermembranaire ; le côté matrice de la membrane interne devient alors chargé négativement tandis que le côté espace intermembranaire de la membrane interne devient positif. C'est cette différence de potentiel électrochimique de chaque côté de la membrane (ou force proton-motrice) qu'utilise l'ATP synthase ; elle fait passer les protons dans le sens inverse en phosphorylant un ADP en ATP. Les molécules d'ATP produites sont ensuite transférées dans le cytosol (Figure 24).

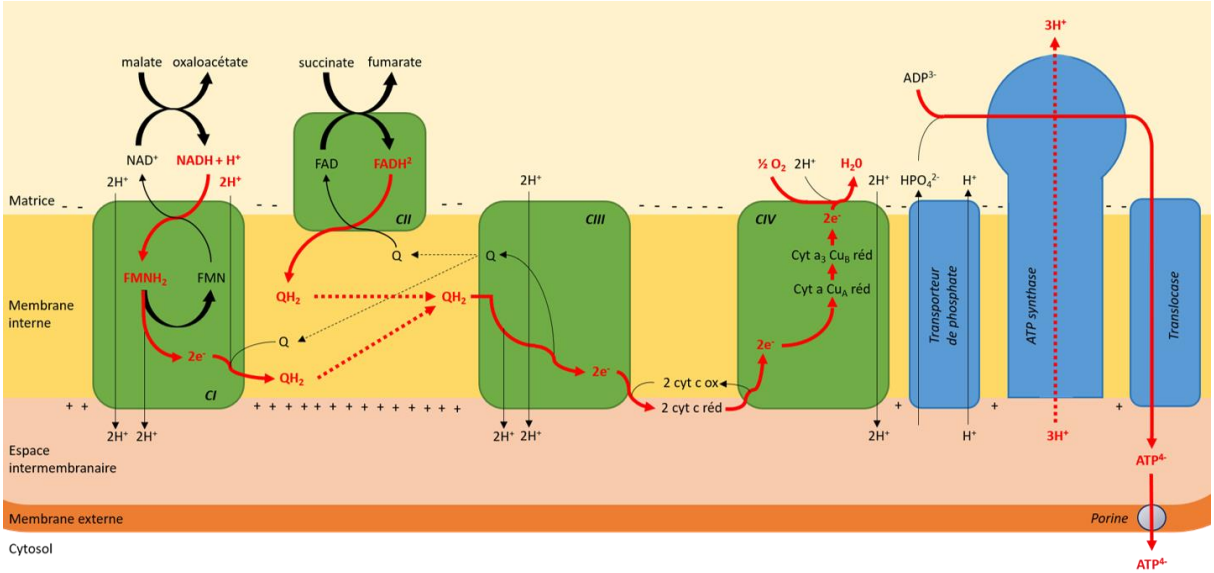


Figure 24 : Complexes de la chaîne respiratoire et synthèse de l'ATP. Inspiré de J. G. Salway. Metabolism at a glance. Fourth edition, Wiley & Sons Inc., 2017

En conditions physiologiques, 0,4 à 4% des électrons s'échappent de la chaîne respiratoire et réagissent avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme formant ainsi des ROS (*Reactive Oxygen Species*). Ces ROS produits en faibles quantité interviennent dans de nombreux processus physiologiques, tels que la prolifération et la différenciation cellulaires, en jouant le rôle de messagers secondaires ou facteurs de transcription (5). Toutefois, lorsque la concentration de ROS augmente et s'accumule, cela devient néfaste pour la cellule. Cette accumulation de ROS peut être la conséquence de processus cellulaires tels que des processus de défense contre les micro-organismes (6) ou de sénescence (7), mais elle peut

être aussi la conséquence d'évènements extérieurs tels que les UV ou des toxines chimiques (8). Ces modifications oxydatives induisent un stress oxydant pour les cellules, à l'origine de nombreuses pathologies. Par exemple, lorsque les ROS réagissent avec la guanine, cette dernière ne s'apparie plus avec la cytosine mais avec l'adénine ce qui engendre des mutations déclenchant cancers et vieillissement cellulaire (9). Lorsque ce sont les protéines qui sont oxydées, soit elles sont dégradées soit elles s'accumulent en intra- ou extra-cellulaire et sont à l'origine de pathologies telles que la maladie d'Alzheimer. Les lipides membranaires peuvent également être oxydés ce qui conduit à une altération de la fluidité membranaire suivi de la mort cellulaire.

II. F. Néoglucogenèse

Lors d'un effort de longue durée, d'un jeûne prolongé ou d'un diabète non maitrisé, les réserves en glucose s'épuisent, les cellules vont alors en synthétiser de novo à partir du lactate ou du glycérol, c'est ce qu'on appelle la néoglucogenèse (Figure 25). La synthèse de glucose à partir de glycérol a lieu dans le foie après hydrolyse complète des triglycérides fournissant le glycérol.

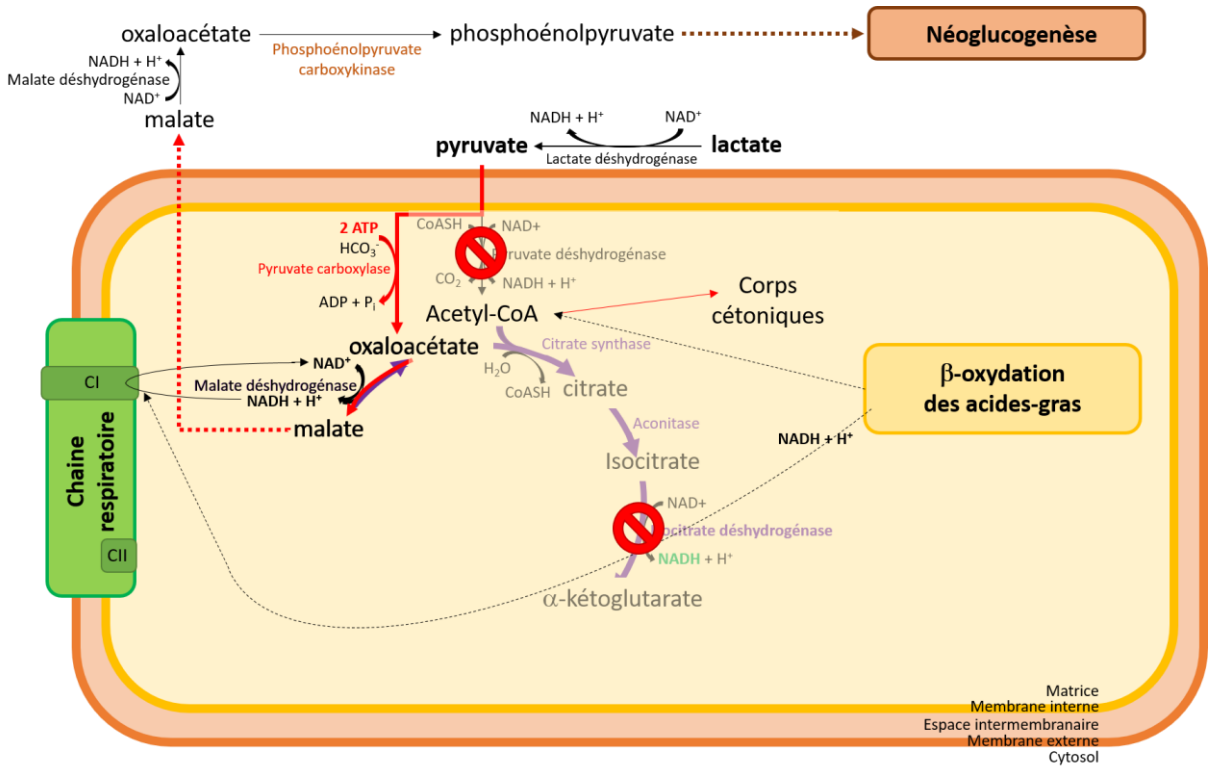


Figure 25 : Néoglucogenèse. Inspiré de J. G. Salway. Metabolism at a glance. Fourth edition, Wiley & Sons Inc., 2017

La β-oxydation des acides-gras fournit des cofacteurs à la chaîne respiratoire, cependant l'accumulation d'acétyl-CoA et de NADH inhibe l'isocitrate déshydrogénase et la pyruvate déshydrogénase, et active la pyruvate carboxylase. En conséquence, le pyruvate n'est pas transformé en acétyl-CoA mais en oxaloacétate (par la pyruvate carboxylase) lequel va être utilisé dans le cytosol

pour faire du phosphoénolpyruvate (après une transformation en malate pour le passage de la membrane mitochondriale), précurseur dans la synthèse de glucose. Les acétyl-CoA qui s'accumulent sont transformés en corps cétoniques (D-2-hydroxybutyrate, acétoacétate et acétone) qui peuvent être réutilisés par le cerveau et les muscles comme fournisseur d'énergie en étant retransformés en acétyl-CoA pour faire fonctionner le cycle de Krebs.

II. G. Les acides aminés

II. G. 1) Catabolisme de l'isoleucine et de la valine

Les cellules musculaires ont la capacité d'utiliser rapidement et majoritairement les acides-gras comme source d'énergie afin de ne pas vider les réserves en glucose nécessaire pour le cerveau. Lors d'efforts de longue durée, comme par exemple un marathon, les fibres musculaires de type I (fibres rouges) vont synthétiser beaucoup d'acétyl-CoA (via la β-oxydation et la glycolyse). Pour que celui-ci soit pris en charge dans le cycle de Krebs, il faut augmenter également la quantité d'oxaloacétate. Pour cela, la dégradation de l'isoleucine et de la valine permet de fournir du succinyl-CoA au cycle de Krebs, permettant ainsi de synthétiser davantage d'oxaloacétate.

II. G. 2) Glutaminolyse :

La glutamine peut être utilisée pour alimenter le cycle de Krebs. Pour cela, elle est transformée en glutamate par l'enzyme glutaminase, puis le glutamate en α-cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase. La glutamine est donc principalement utilisée par les cellules en prolifération qui ont besoin de beaucoup d'ATP.

II. G. 3) Métabolisme de l'arginine :

L'arginine est le précurseur de la créatine et la source principale d'oxyde nitrique. Cette découverte a valu le prix Nobel à Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, and Ferid Murad en 1998 (10). L'arginine peut être soit transformée en NO par l'enzyme iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*), soit transformée en ornithine par l'enzyme Arg1 (arginase 1) (Figure 26).

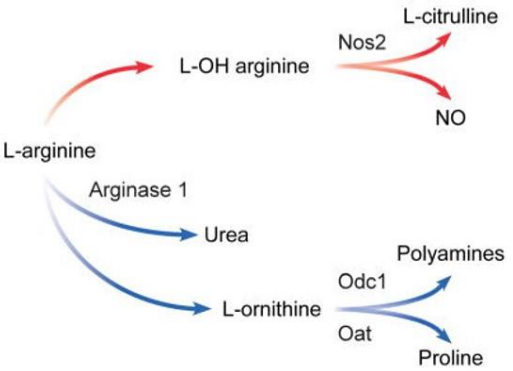


Figure 26 : Métabolisme de l'arginine. Issu de Odegaard, et al Annu Rev Pathol. 2011. Nos2 est l'ancienne abréviation de l'enzyme iNOS. Odc1 = ornithine décarboxylase ; Oat = ornithine aminotransférase

II. G. 4) Métabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine

La phénylalanine peut être hydrolysée en tyrosine qui est le précurseur de nombreuses molécules : la mélanine, les hormones thyroïdiennes et les catécholamines (dopamine, noradrénaline et adrénaline). De plus, la tyrosine peut également être oxydée pour produire de l'oxaloacétate et du fumarate.

II. G. 5) Métabolisme de la glycine

La glycine est formée à partir de la sérine et intervient dans la synthèse de protéines cellulaires, des purines, du collagène, des porphyrines, de la créatine et du glutathion (extrait de J. G. Salway. Metabolism at a glance. Fourth edition, Wiley & Sons Inc., 2017).

II. H. Synthèse des acides gras

La synthèse des acides gras à partir du glucose est activée soit lorsque la cellule a trop de glucose, soit lorsqu'elle est en croissance. Après avoir synthétisé tout l'ATP dont elle a besoin, la cellule stocke son excès de glucose dans les stocks hépatiques sous forme de glycogène. Lorsque ces stocks sont pleins, elle va alors stocker son glucose en excès sous forme d'acides gras qui seront pris en charge par les adipocytes. Si la cellule est en croissance, elle va devoir transformer le glucose en acides gras afin de fabriquer des membranes et sécréter des molécules. La forte concentration de NADH va inhiber l'isocitrate déshydrogénase, il va alors y avoir accumulation de citrate, lequel va être transporté dans le cytosol où il va être transformé en acétyl-CoA, précurseur de la synthèse d'acides-gras (Figure 27).

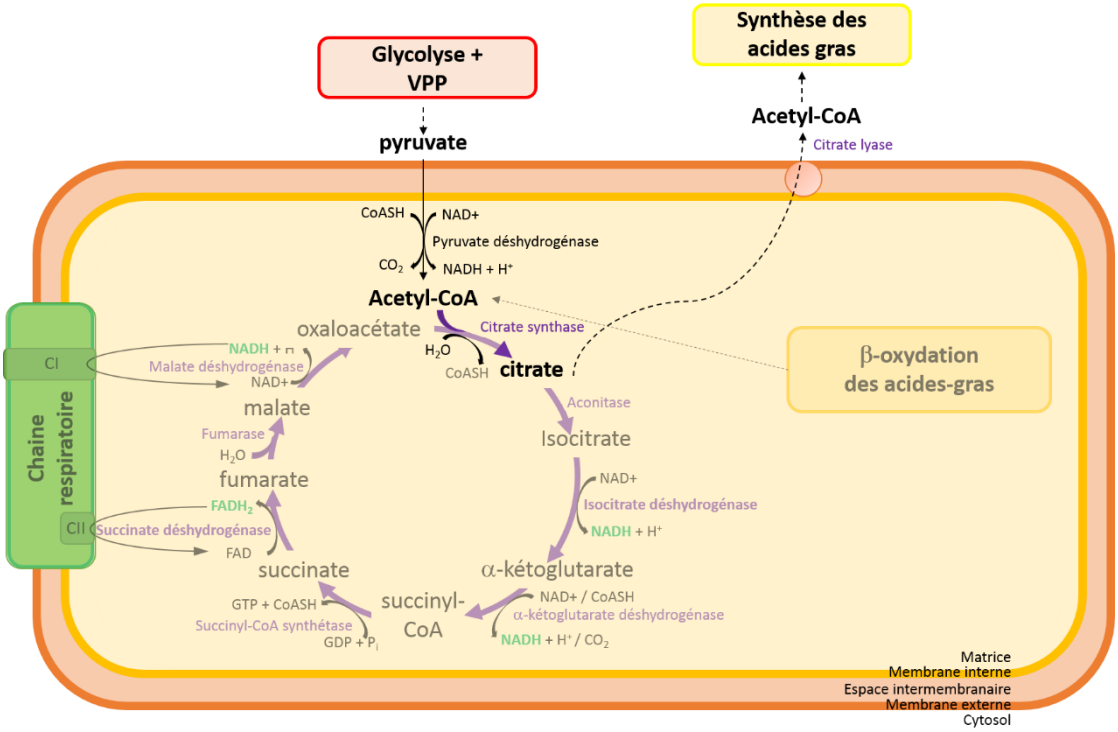


Figure 27 : Synthèse des acides gras. Inspiré de J. G. Salway. Metabolism at a glance. Fourth edition, Wiley & Sons Inc., 2017

La synthèse des acides gras est généralement activée par la signalisation via mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) qui régule une enzyme clé de la synthèse des acides gras : SREBP.

Toutes les voies du métabolisme sont interconnectées entre elles (Figure 28) car les produits de l'une sont les substrats de l'autre afin de permettre la croissance et la survie cellulaires. La glycolyse, la VPP, la synthèse des acides gras, la β-oxydation, le cycle de Krebs et les voies des acides aminés sont chacune régulées en fonction des besoins cellulaires.

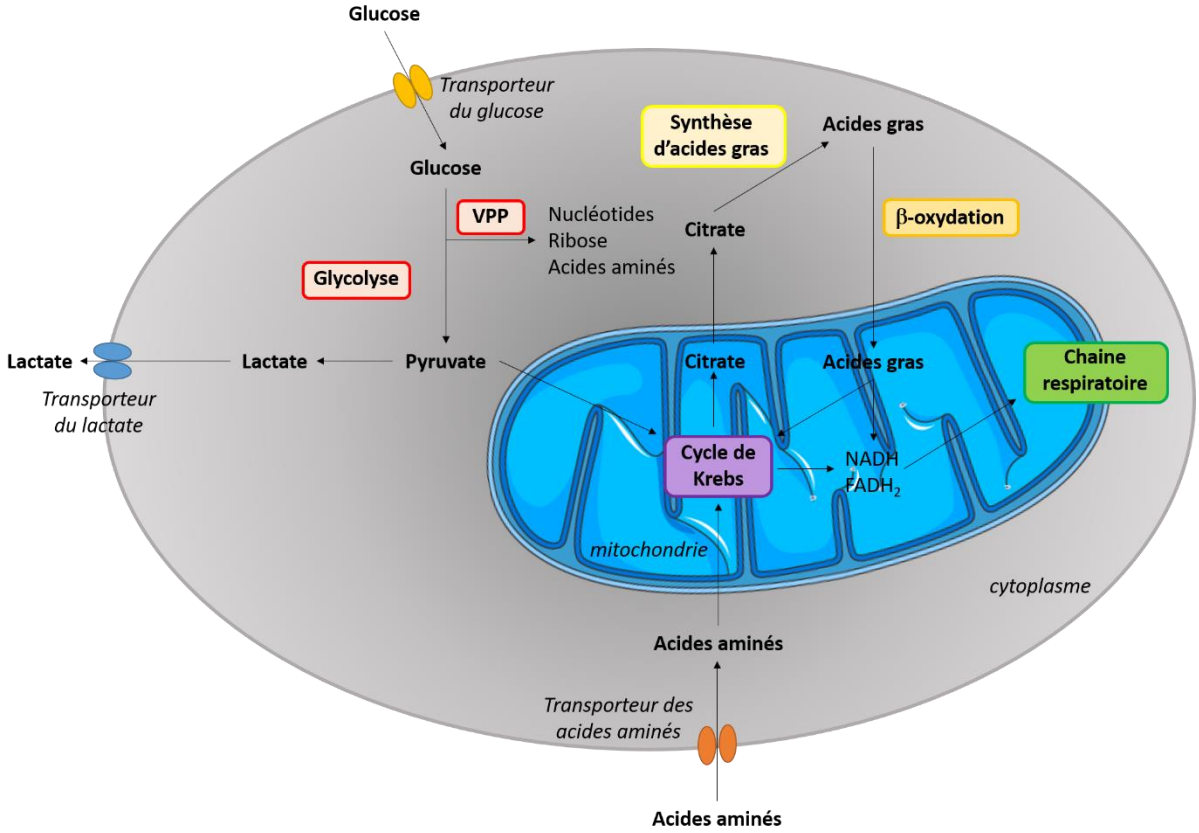


Figure 28 : Interactions entre les voies métaboliques. Inspiré de O'Neill, et al. Nat Rev Immunol. 2016.
La glycolyse convertit le glucose en pyruvate qui peut ensuite être converti en lactate qui sera excrété. Le pyruvate peut aussi entrer dans le cycle de Krebs, via l'acétyl-CoA, où il va permettre de générer du NADH et du $FADH_2$ qui alimenteront la chaîne respiratoire pour synthétiser de l'ATP. L'acétyl-CoA, le NADH et $FADH_2$ peuvent également provenir de la β-oxydation des acides gras. Le glucose alimente aussi la voie des pentoses phosphates (VPP) qui génère du ribose, des acides aminés et du NADPH. La synthèse des acides gras utilise le NADPH de la VPP et le citrate issu du cycle de Krebs. Les acides aminés peuvent également alimenter le cycle de Krebs.

III. Métabolisme des macrophages

Les molécules présentes dans l'environnement d'une cellule peuvent agir sur celle-ci en reprogrammant son métabolisme afin qu'elle s'adapte, survive et réponde à son environnement. Par exemple, la liaison d'un pathogène sur un PRR ainsi que l'hypoxie vont plutôt inhiber le cycle de Krebs et la respiration mitochondriale au profit de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphates et de la synthèse d'acides gras provoquant une réponse immune inflammatoire antibactérienne. A l'inverse, la présence d'IL-4 et d'oxygène dans l'environnement vont activer le fonctionnement du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire induisant ainsi une réponse immunitaire de type antiparasitaire immunorégulatrice.

III. A. Macrophages pro-inflammatoires

Les macrophages pro-inflammatoires (M1) activés par le LPS ont un métabolisme basé sur une augmentation de l'utilisation du glucose via la glycolyse (11,12) et une diminution de la respiration mitochondriale (13). Cela leur permet d'induire la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β), la phagocytose (fabrication de membranes) et la sécrétion de molécules antibactériennes (ROS, NO). L'utilisation de la glycolyse en conditions aérobies s'appelle l'effet Warburg et est induite par la liaison du LPS (14,15). La liaison du LPS sur le Toll-like receptor 4 (TLR4) des macrophages induit l'activation des facteurs de transcription HIF1α (*Hypoxia-inducible factor 1α)* et NF-κB (*Nuclear Factor-κB*) responsables de l'expression de gènes pro-inflammatoires (3), et la surexpression du transporteur au glucose GLUT1 à la surface cellulaire pour alimenter la glycolyse (16) ainsi que les enzymes nécessaires à cette voie, telle que l'hexokinase 1 (HK1) et la PKM2 (*pyruvate kinase isoform 2*) (17,18). L'enzyme PKM2 intervient également sous forme dimérique dans le noyau où elle induit l'expression des gènes dépendant de HIF-1α (enzymes glycolytiques et IL-1β) (18,19). L'hexokinase 1 intervient également hors de la glycolyse. Elle active l'inflammasome NLRP3 (*NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3*) lequel est un régulateur majeur de la caspase 1 qui génère l'IL-1β mature (20). Dans les macrophages M1, la glycolyse est couplée à la VPP. L'inhibition de l'enzyme CARKL par le LPS active la VPP (13) qui génère du NADPH utilisé pour la production rapide de ROS (via la NADPH oxydase) afin d'éliminer les pathogènes (21,22), et la synthèse des acides gras. Les M1 ont un cycle de Krebs inhibé au niveau de deux réactions, celle de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) et celle de la succinate déshydrogénase (SDH), induisant l'accumulation de citrate et de succinate qui vont activer de nombreuses voies (Figure 29). Le citrate accumulé va être transporté jusqu'au cytosol où il va permettre la synthèse des acides gras (comme vu dans le paragraphe II. H). La synthèse des acides gras est un processus nécessaire pour la réponse pro-inflammatoire (3). Le citrate peut également servir à générer du NO, des prostaglandines et de l'itaconate (antibactérien pouvant inhiber la succinate déshydrogénase) (23).

Plus précisément, le citrate peut être retransformé en oxaloacétate et entrer dans la voie de dérivation aspartate-arginosuccinate (AASS) qui alimente la voie convertissant l'arginine en NO et en citrulline. Le NO est synthétisé à partir de l'arginine via l'enzyme iNOS, et est nécessaire pour la défense contre les pathogènes (intracellulaires) (24). De plus, l'inhibition de la voie AASS inhibe la sécrétion de NO et d'IL-6 par les M1 (25).

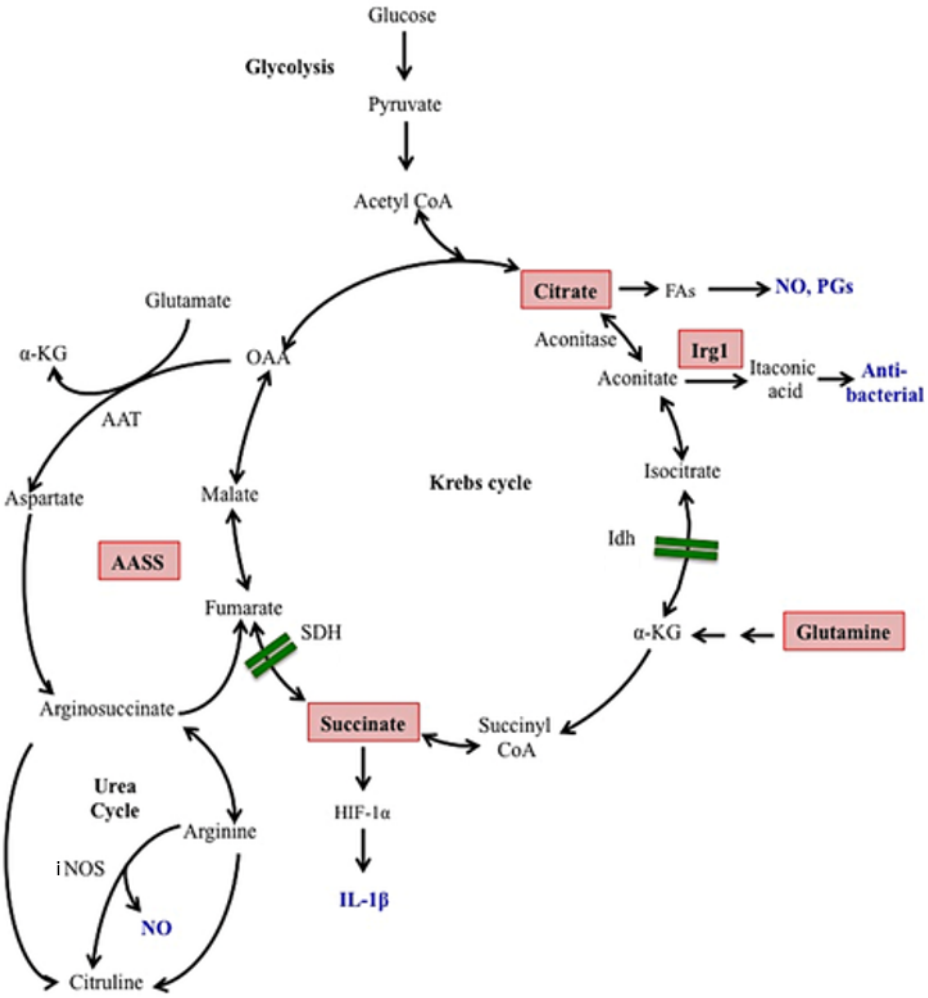


Figure 29 : Inhibitions du cycle de Krebs et dérivations métaboliques dans les M1. A partir de Mills, E.L. and O'Neill, L.A. Eur. J. Immunol. 2016. Itaconic acid = itaconate

Le citrate est aussi transformé, indirectement, en itaconate (ou acide itaconique) par l'enzyme Irg1 (*Immune-responsive gene 1*) dont l'expression est induite par la signalisation via le TLR4 (26,27). L'itaconate est reconnu comme ayant des propriétés antimicrobiennes et comme étant responsable de l'inhibition de la SDH (28). Des analyses couplées de métabolomique et de transcriptomique ont identifié Irg1 comme l'une des enzymes présentant le plus de régulation positive de leurs transcrits dans les M1 par rapport aux M0 (25). L'accumulation de succinate dans les M1 active Hif-1α (29). Si la β-oxydation des acides gras est fortement diminuée dans les M1, leur synthèse, en revanche, est fortement augmentée. La synthèse des lipides est induite par trois facteurs principaux : un faible pH

extracellulaire, l'activation par le LPS et une faible tension tissulaire en oxygène (30). Le faible pH extracellulaire est dû à la sécrétion de lactate issu de la glycolyse. La liaison du LPS sur les macrophages M1 induit la surexpression du facteur SREBP, une enzyme clé de la synthèse des acides gras (31). La faible tension tissulaire en oxygène est liée à des environnements hypoxiques, tels que les plaques d'athérome avancées. Par ailleurs, l'expression du CD36, responsable de l'internalisation des LDLox et des acides gras libres, est augmentée dans les M1 par rapport aux M0 (32). Finalement, l'absence de β-oxydation des acides gras ainsi que la synthèse et l'internalisation des lipides sont en faveur de l'activation du stockage de lipides dans les macrophages. La Figure 30 ci-dessous regroupe les voies métaboliques utilisées par les M1.

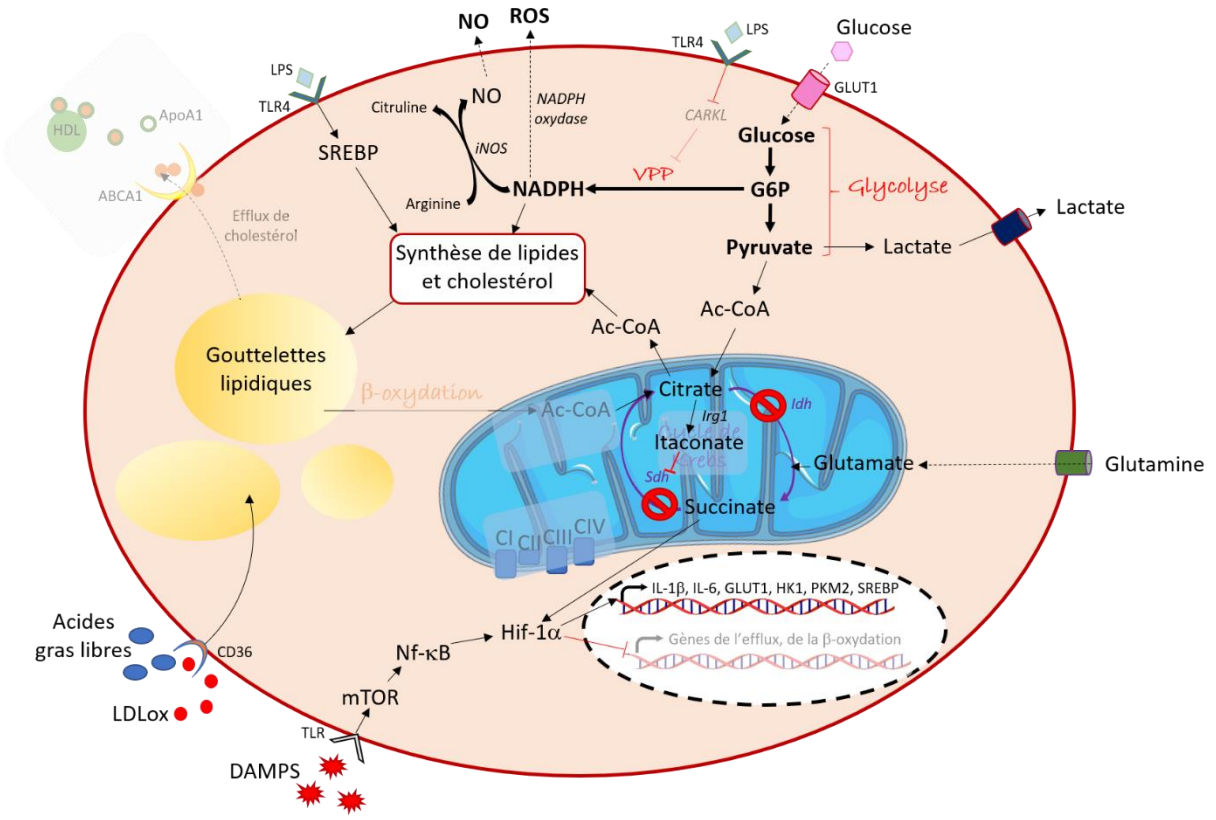


Figure 30 : Voies métaboliques des macrophages pro-inflammatoires M1.
Les M1 ont une forte glycolyse à l'issue de laquelle le pyruvate est transformé en lactate. La voie des pentoses phosphates (VPP) est également activée (grâce à l'inhibition de CARKL par la liaison du LPS) afin de fournir du NADPH qui sert à faire des ROS et du NO via le métabolisme de l'arginine. La liaison du LPS sur le TLR4 va également induire la synthèse de cholestérol. Le cycle de Krebs est inhibé à deux niveaux. D'abord au niveau de l'isocitrate déshydrogénase (Idh), ce qui fait que le citrate s'accumule et sert à la synthèse des acides gras et indirectement (après retransformation en oxaloacétate) à la synthèse de NO dans le métabolisme de l'arginine. Le citrate va également être transformé en itaconate qui va inhiber la succinate déshydrogénase (Sdh) menant à la deuxième inhibition du cycle de Krebs. Cela va induire l'accumulation de succinate responsable de l'activation du facteur de transcription HIF-1α, induisant ainsi l'expression de gènes pro-inflammatoires, glycolytique et de la synthèse des lipides. Le métabolisme de la glutamine permet d'alimenter le cycle de Krebs en α-cétoglutarate, via le glutamate, pour permettre la synthèse de succinate.

III. B. Macrophages immunorégulateurs

Les macrophages M2 ont un métabolisme basé principalement sur le couplage du cycle de Krebs avec la chaîne respiratoire mitochondriale (3,12). Les M2 ont également une glycolyse augmentée par rapport aux cellules non activées mais, contrairement aux M1, non couplée à la VPP car l'enzyme CARKL est active (non inhibée par le LPS) (13). La liaison de l'IL-4 sur les macrophages active la voie Akt puis mTORC1 qui augmente le métabolisme du glucose (33). La liaison de l'IL-4 et de l'IL-13 va également activer STAT6 qui induit la synthèse des régulateurs métaboliques tels que PGC-1β et PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) -γ et –δ, afin d'initier le métabolisme oxydatif via la biogenèse mitochondriale, et de diminuer l'inflammation (34,35). De plus, les macrophages immunorégulateurs surexpriment le facteur KLF2 qui diminue l'expression de CCL2 et inhibe la voie Nf-κB à l'origine de la voie pro-inflammatoire (36). Les macrophages M2 synthétisent leur ATP principalement via la respiration mitochondriale couplée au cycle de Krebs. Pour alimenter le cycle de Krebs, les M2 peuvent utiliser le pyruvate issu de la glycolyse mais l'Acétyl-CoA provenant de la β-oxydation est préférentiellement utilisé (33). Les sources d'acides gras pour soutenir la β-oxydation proviennent principalement de l'internalisation de triglycérides via le CD36, suivie d'une lipolyse par l'enzyme LAL (*lysosomal acid lipase*) (37). L'utilisation préférentielle de la β-oxydation pourrait expliquer pourquoi les M2 accumulent moins de lipides que les M1. Cependant, les M2 possèdent de grandes réserves glycolytiques (intermédiaires nécessaires pour la glycolyse) leur permettant de switcher vers la glycolyse seule, si la production d'ATP mitochondriale est bloquée (24). Le métabolisme de l'arginine dans les M2 n'utilise pas l'iNOS comme pour les M1, mais la voie de l'arginase-1 qui produit les précurseurs polyamines urée et ornithine nécessaires à la synthèse de collagène et la prolifération cellulaire (38). *Arg-1* (Arginase 1) est d'ailleurs le seul gène M2 à être toujours induit par l'IL-4 après une première stimulation LPS-IFN-γ (24).

La Figure 31 ci-dessous regroupe les voies du métabolisme des macrophages M2.

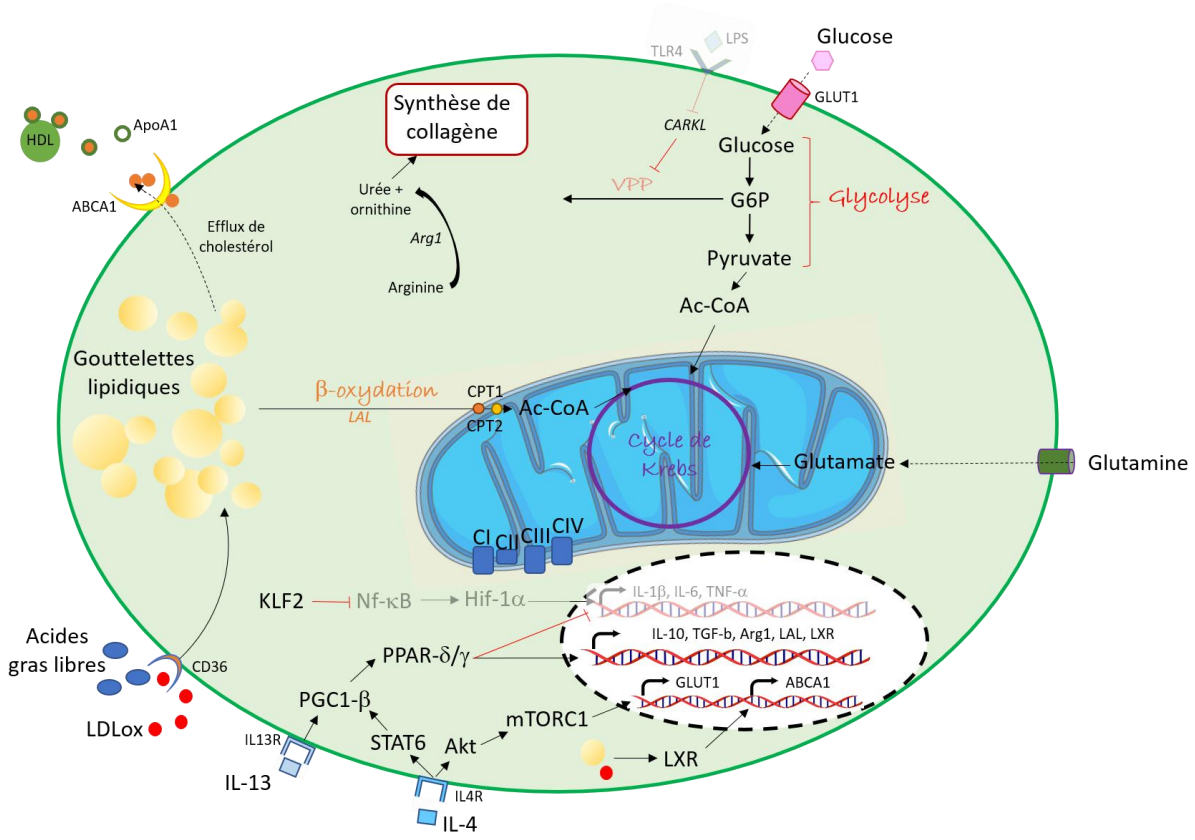


Figure 31 : Voies métaboliques des macrophages pro-inflammatoires M2.
Les macrophages M2 produisent leur ATP principalement via le cycle de Krebs couplé à la chaîne respiratoire mitochondriale. Pour alimenter le cycle de Krebs, les M2 utilisent la β-oxydation des acides gras ainsi que la glycolyse et le métabolisme de la glutamine. Les enzymes CPT1/CPT2 permettent de transférer les acides gras du cytosol à la matrice mitochondriale. La glycolyse est présente mais non couplée à la VPP. Les M2 convertissent l'arginine en urée et ornithine via l'arginase 1 nécessaire pour la prolifération cellulaire. Dans les M2, l'efflux de cholestérol est réalisé grâce à la protéine ABCA1. La liaison de l'IL-4 et IL-13 vont activer des voies de signalisation menant à l'induction de l'expression des gènes immunorégulateurs, glycolytiques, et impliqués dans la β-oxydation, ainsi qu'à l'inhibition de l'expression de gènes pro-inflammatoires.

Les macrophages M2 sont les principaux responsables de l'élimination des cellules apoptotiques ou sénescentes (efferocytose). L'efferocytose est un processus nécessaire dans la résolution de l'athérosclérose. Or, des études récentes ont montré que les métabolites issus de l'efferocytose d'une cellule sénescente pouvaient influer sur le métabolisme du macrophage réalisant l'efferocytose, et même sur les cellules voisines (17). Par exemple, les acides gras issus de la cellule phagocytée peuvent alimenter la β-oxydation et aboutir à la production d'IL-10. L'arginine endocytée est alors transformée par l'arginase 1 en putrescine qui est nécessaire pour la poursuite de l'efferocytose (39). D'autres métabolites, tels que le cholestérol ou le lactate, peuvent être excrétés par la cellule. Il a été montré que le lactate pouvait agir sur les cellules musculaires lisses et induire leur prolifération et migration (40). Dans le cadre de l'athérosclérose, les macrophages réalisant l'efferocytose des macrophages

spumeux nécrotiques sont confrontés à d'énormes quantités de cholestérol toxiques qu'ils doivent détoxifier ou éliminer (via l'efflux) (41,42). La détoxification est effectuée par l'enzyme ACAT (*acyl-CoA :cholesterol ester transferase*) qui transforme le cholestérol libre en esters de cholestérol qui seront stockés dans des gouttelettes lipidiques (43) afin d'éviter qu'ils ne forment des cristaux de cholestérol. L'efflux de cholestérol est gouverné par les récepteurs nucléaires LXRs (*Liver X receptors*) qui détectent l'excès de cholestérol et induisent l'expression de gènes anti-inflammatoires et impliqués dans le métabolisme lipidique (absorption, transport, efflux de cholestérol). C'est la présence de LDLox et de cholestérol qui active les LXRs qui vont induire l'expression d'ABCA1, d'ABCG1 et de l'ApoE pour favoriser l'efflux de cholestérol (44–46). Lorsque les gouttelettes lipidiques fusionnent avec les lysosomes, l'enzyme LAL va hydrolyser les esters de cholestérol en cholestérol libres pour qu'ils puissent être pris en charge par ABCA1 et efflués, c'est ce qu'on appelle la lipophagie (47,48). L'enzyme LAL est également impliquée dans le maintien de l'efferocytose car elle permet la synthèse de 25- et 27-hydroxycholestérol (25- et 27-OHC), nécessaires au maintien de l'intégrité des membranes mitochondriales. En effet, si les mitochondries sont défectueuses (par exemple en l'absence des 25- et 27-OHC), elles vont activer indirectement l'inflammasome NLRP3 empêchant ainsi l'efferocytose (47). Les 25- et 27-OHC sont également responsables de l'activation des LXRs qui favorisent l'efflux de cholestérol, de l'inhibition des SREBP qui induisent la synthèse de cholestérol, et de l'inhibition de l'inflammasome (49,50). L'afflux de métabolites dans la cellule réalisant l'efferocytose agit également sur les mitochondries en augmentant leur potentiel de membrane, ce qui, à long terme, peut être néfaste. Pour contrer cela, la cellule a mis en place des protéines de découplage UCP2 (*uncoupling protein 2*) qui transfèrent des protons de l'espace intermembranaire à la matrice mitochondriale diminuant la force proton-motrice, et permettent ainsi de continuer à réaliser l'efferocytose (51). Cependant, à ce jour, l'origine exacte de l'arrêt de l'efferocytose n'est pas connue. Les équipe de recherche travaillant sur ce sujet pourront peut-être permettre de découvrir comment rétablir cette fonction et permettre d'éliminer les macrophages apoptotiques et nécrotiques afin d'éviter la formation du cœur nécrotique.

III. C. Métabolisme dans les plaques d'athérome et macrophages spumeux

De manière générale, les macrophages M1 ont un métabolisme basé sur la glycolyse et la synthèse des acides gras car ils ont besoin de beaucoup d'énergie rapidement pour synthétiser de nouvelles membranes et produire des cytokines inflammatoires. Les macrophages M2 à l'inverse se multiplient lentement. Ils utilisent un système très rentable et efficace, d'où leur forte utilisation de la β-oxydation et de la chaîne respiratoire. Cependant, l'accumulation de lipides, lipoprotéines, cholestérol à l'intérieur des plaques d'athérome, induit, en plus d'un changement de fonction, une reprogrammation métabolique. Les monocytes, macrophages M1 ou macrophages M2 se transforment alors en macrophages spumeux.

Dans les plaques d'athérome, la liaison des LDLox sur le CD36 des cellules va induire la phosphorylation de l'enzyme PKM2 qui va activer le facteur Hif-1α provoquant l'expression de l'IL-1β, de GLUT1, du CD36 et de la lactate déshydrogénase (52). Les macrophages spumeux sont soumis, en outre, à une accumulation de LDLox et de cholestérol dans les cellules qui va induire une déstabilisation de la fonction autophagique des macrophages. Plus précisément, les LDLox inhibent les cathepsines, molécules indispensables dans le maintien de l'autophagie par les lysosomes (53). L'autophagie est nécessaire pour le maintien des cellules car elle permet de détruire les protéines ou organelles endommagées, évitant ainsi à la cellule d'entrer en apoptose. L'accumulation de cholestérol à l'intérieur des cellules (par l'internalisation des LDL via le CD36) aboutit à la formation de cristaux de cholestérol qui déstabilisent les lysosomes. Le contenu lysosomal (cathepsines, ROS) est alors libéré dans le cytoplasme et va activer l'inflammasome NLRP3, provoquant ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β) responsables de la progression des plaques (54,55). C'est ce qui explique pourquoi les cathepsines sont liées à une progression de l'athérosclérose ; elles sont généralement libérées des lysosomes des macrophages spumeux, et induisent leurs effets protéolytiques dans et hors des cellules, notamment sur la matrice extracellulaire, rendant ainsi les plaques vulnérables (41,56,57). De plus, la détérioration des lysosomes va déstabiliser l'enzyme LAL qui ne pourra plus synthétiser les oxystérols 25- et 27-hydroxycholestérol (25- et 27-OHC), à l'origine de l'activation des LXRs (l'efflux de cholestérol ne sera alors pas activé) et de la suppression de la voie des SREBPs, activant ainsi l'inflammasome NLRP3 (50). Par ailleurs, le dysfonctionnement de l'autophagie va induire un stress mitochondrial aboutissant à un métabolisme oxydatif altéré. Lorsque la chaîne respiratoire mitochondriale est altérée, elle va également induire la production de ROS activant le facteur Hif-1α responsable du développement d'un profil pro-inflammatoire (58). Les ROS vont également oxyder les LDL circulants dans la paroi artérielle, formant ainsi une boucle d'activation de l'inflammation. Enfin,

l'apoptose cellulaire peut être déclenchée lorsque le système de fusion/fission des mitochondries est défaillant. Ce système se met généralement en place afin de détruire les mitochondries dysfonctionnelles via la mitophagie (autophagie des mitochondries) et d'induire la biogenèse de nouvelles mitochondries (59). Dans les plaques avancées, l'hypoxie joue également un rôle très important dans le développement des macrophages spumeux. En effet, elle active le facteur Hif-1α qui diminue l'expression des enzymes impliquées dans la dégradation des acides gras (β-oxydation) et augmente celle des enzymes responsables de la synthèse d'acides gras. Il en découle une accumulation de gouttelettes lipidiques à l'intérieur des macrophages qui deviennent spumeux (60).

Les macrophages spumeux semblent donc avoir un métabolisme essentiellement glycolytique grâce à l'induction de GLUT1, de la PKM2, de la lactate déshydrogénase (qui permet de transformer le pyruvate en lactate pour refaire du NAD^+ nécessaire dans la voie de la glycolyse) et à l'inhibition de la β-oxydation et de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ils ont également un processus d'efflux du cholestérol altéré, une autophagie déficiente et sont soumis à une forte inflammation via l'inflammasome NLRP3 et la synthèse des gènes inflammatoires (via Hif-1α) ; tout cela mène à l'accumulation intracellulaire de lipides. L'activation de ces mécanismes génère des macrophages spumeux non fonctionnels qui vont entrer en apoptose.

La Figure 32 ci-dessous regroupe les voies du métabolisme des macrophages spumeux.

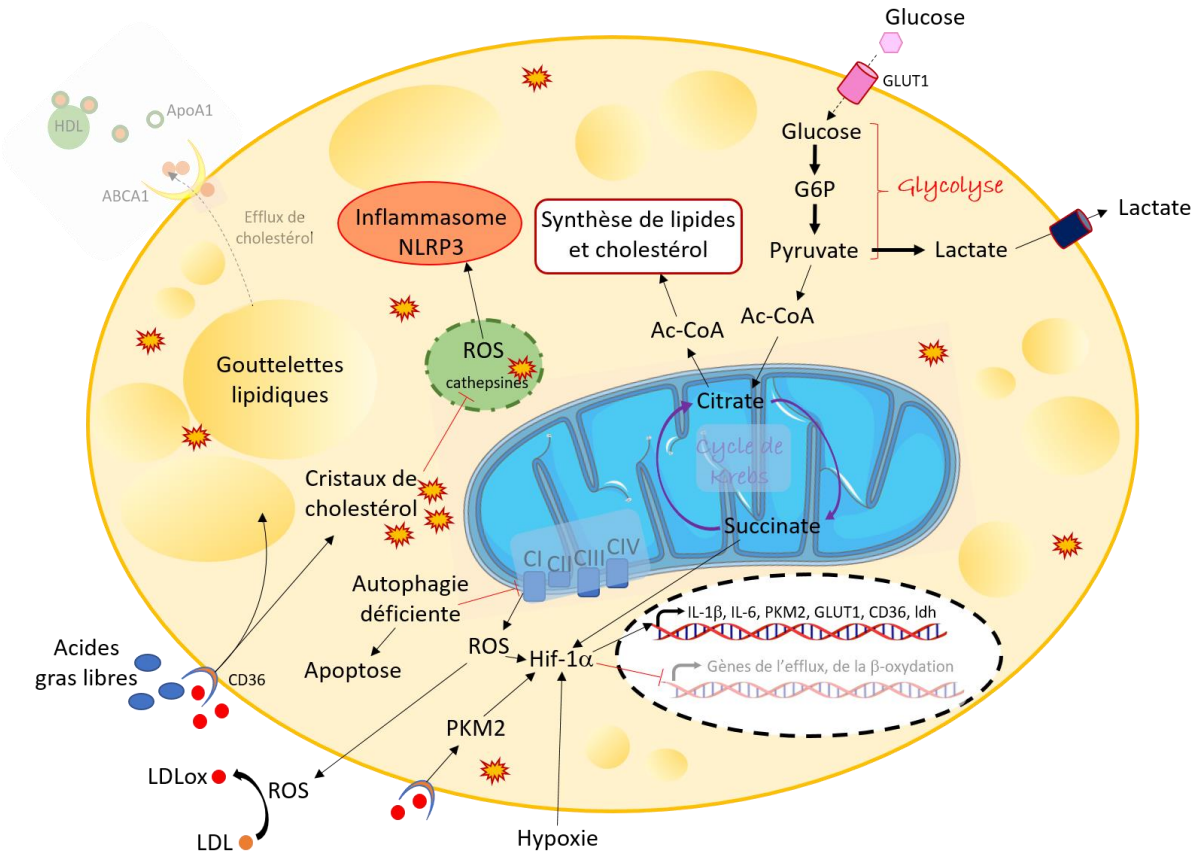


Figure 32 : Métabolisme des macrophages spumeux.
La liaison des LDLox au CD36 induit la phosphorylation de l'enzyme PKM2 qui va activer Hif-1α et induire l'expression de gènes inflammatoires et glycolytiques. L'internalisation de grandes quantités de lipides oxydés, cholestérol, acides gras libres, inhibe la fonction lysosomale libérant des ROS qui vont activer l'inflammasome, déclenchant ainsi le processus inflammatoire. L'autophagie déficiente va également perturber les mitochondries qui vont également produire des ROS. Ceux-ci vont activer le facteur Hif-1α responsable de l'activation des gènes pro-inflammatoire et de la synthèse des acides gras. Les macrophages spumeux fabriquent leur ATP grâce à la glycolyse étant donné que leurs mitochondries ne sont plus fonctionnelles. Enfin, les gouttelettes lipidiques s'accumulent car les macrophages n'ont plus de régulation du métabolisme lipidique. Ils synthétisent et internalisent beaucoup d'acides gras, et ne sont plus en capacité de réaliser l'efflux.

Les macrophages inflammatoires ont un métabolisme basé sur une augmentation de la glycolyse (pour la synthèse d'ATP) reliée à la voie des pentoses phosphates (produisant des ROS et du NADPH pour, respectivement, la fonction antibactérienne et la synthèse d'acides gras), un cycle de Krebs clivé permettant l'accumulation de citrate pour la synthèse d'acides gras, et la transformation de l'arginine en NO via l'enzyme iNOS (pour la fonction antibactérienne). Les macrophages immunorégulateurs ont un métabolisme utilisant majoritairement la phosphorylation oxydative pour générer de l'ATP, reliée à un cycle de Krebs complet nourri par la glycolyse et la β-oxydation des acides-gras. L'efferocytose, processus nécessaire dans l'élimination des macrophages apoptotiques, est plutôt un événement de régulation de l'inflammation, mais à cause des métabolites ingérés, ce processus devient inefficient induisant l'inflammation des cellules. De plus, les cellules mortes vont s'accumuler

aboutissant au développement du cœur nécrotique. Il faut donc trouver un moyen de rétablir cette efferocytose. Plusieurs pistes existent, soit reprogrammer les macrophages vers un profil immunorégulateur (à l'inverse de ce qui est fait en cancérologie), soit induire l'efflux de cholestérol (via l'induction des LXRs), soit réactiver des protéines inhibées (telles que les UCP). Dans tous les cas, il faut arriver à cibler spécifiquement les macrophages présents dans la plaque pour ne pas agir sur les autres macrophages de l'organisme. Pour cela, l'utilisation d'anticorps thérapeutiques pour cibler spécifiquement les macrophages présents dans les plaques d'athérome est tout à fait pertinente.

Références :

1. Oren R, Farnham AE, Saito K, Milofsky E, Karnovsky ML. METABOLIC PATTERNS IN THREE TYPES OF PHAGOCYTIZING CELLS. J Cell Biol. 1963 Jun 1;17(3):487–501.

2. Newsholme P, Curi R, Gordon S, Newsholme EA. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. Biochem J. 1986 Oct 1;239(1):121–5.

3. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. Nat Rev Immunol. 2016 Sep;16(9):553–65.

4. Sampol D, Ostrofet E, Jobin M-L, Raffard G, Sanchez S, Bouchaud V, et al. Glucose and lactate metabolism in the awake and stimulated rat: a 13C-NMR study. Front Neuroenergetics. 2013 May 31;5.

5. Binder CJ, Papac-Milicevic N, Witztum JL. Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease. Nat Rev Immunol. 2016;16(8):485–97.

6. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. J Leukoc Biol. 2005 May;77(5):598–625.

7. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000 Nov 9;408(6809):239–47.

8. Nathan C, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. Nat Rev Immunol. 2013 May;13(5):349–61.

9. Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, et al. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. Oxid Med Cell Longev. 2019 Aug 5;2019.

10. Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. Front Immunol. 2014 Oct 27;5.

11. Rodríguez-Prados J-C, Través PG, Cuenca J, Rico D, Aragonés J, Martín-Sanz P, et al. Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. J Immunol. 2010 Jul 1;185(1):605–14.

12. Jha AK, Huang SC-C, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, et al. Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. Immunity. 2015 Mar 17;42(3):419–30.

13. Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P, et al. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. Cell Metab. 2012 Jun 6;15(6):813–26.

14. Escoll P, Buchrieser C. Metabolic reprogramming of host cells upon bacterial infection: Why shift to a Warburg-like metabolism? FEBS J. 2018;285(12):2146–60.

15. Tang C-Y, Mauro C. Similarities in the Metabolic Reprogramming of Immune System and Endothelium. Front Immunol. 2017;8:837.

16. Fukuzumi M, Shinomiya H, Shimizu Y, Ohishi K, Utsumi S. Endotoxin-induced enhancement of glucose influx into murine peritoneal macrophages via GLUT1. Infect Immun. 1996 Jan;64(1):108–12.

17. Tabas I, Bornfeldt KE. Intracellular and Intercellular Aspects of Macrophage Immunometabolism in Atherosclerosis. Circ Res. 2020 Apr 24;126(9):1209–27.

18. Palsson-McDermott EM, Curtis AM, Goel G, Lauterbach MA, Sheedy FJ, Gleeson LE, et al. Pyruvate Kinase M2 regulates Hif-1α activity and IL-1β induction, and is a critical determinant of the Warburg Effect in LPS-activated macrophages. Cell Metab. 2015 Jan 6;21(1):65–80.

19. Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. Cell. 2011 May 27;145(5):732–44.

20. Moon J-S, Hisata S, Park M-A, DeNicola GM, Ryter SW, Nakahira K, et al. mTORC1-Induced HK1-Dependent Glycolysis Regulates NLRP3 Inflammasome Activation. Cell Rep. 2015 Jul 7;12(1):102–15.

21. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2007 Jan;87(1):245–313.

22. Leto TL, Geiszt M. Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. Antioxid Redox Signal. 2006 Oct;8(9–10):1549–61.

23. Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouskova M, Nair S, Vincent EE, Loginicheva E, et al. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. Cell Metab. 2016 12;24(1):158–66.

24. Van den Bossche J, Baardman J, Otto NA, van der Velden S, Neele AE, van den Berg SM, et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. Cell Rep. 2016 11;17(3):684–96.

25. Jha AK, Huang SC-C, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. Immunity. 2015 Mar 17;42(3):419–30.

26. Németh B, Doczi J, Csete D, Kacso G, Ravasz D, Adams D, et al. Abolition of mitochondrial substrate-level phosphorylation by itaconic acid produced by LPS-induced Irg1 expression in cells of murine macrophage lineage. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2016 Jan;30(1):286–300.

27. Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, Pailot A, Reiling N, Goldmann O, et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 May 7;110(19):7820–5.

28. Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouskova M, Nair S, Vincent EE, Loginicheva E, et al. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. Cell Metab. 2016 12;24(1):158–66.

29. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1β through HIF-1α. Nature. 2013 Apr;496(7444):238–42.

30. Lu M, Kho T, Munford RS. Prolonged Triglyceride Storage in Macrophages: pHo trumps pO2 and TLR4. J Immunol Baltim Md 1950. 2014 Aug 1;193(3):1392–7.

31. Ye Q, Lei H, Fan Z, Zheng W, Zheng S. Difference in LDL receptor feedback regulation in macrophages and vascular smooth muscle cells: foam cell transformation under inflammatory stress. Inflammation. 2014 Apr;37(2):555–65.

32. Bories GFP, Leitinger N. Macrophage metabolism in atherosclerosis. FEBS Lett. 2017;591(19):3042–60.

33. Covarrubias AJ, Aksoylar HI, Yu J, Snyder NW, Worth AJ, Iyer SS, et al. Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. eLife. 2016 Feb 19;5.

34. Odegaard JI, Chawla A. Alternative Macrophage Activation and Metabolism. Annu Rev Pathol. 2011;6:275–97.

35. Namgaladze D, Brüne B. Fatty acid oxidation is dispensable for human macrophage IL-4-induced polarization. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids. 2014 Sep 1;1841(9):1329–35.

36. van Tits LJH, Stienstra R, van Lent PL, Netea MG, Joosten LAB, Stalenhoef AFH. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: A crucial role for Krüppel-like factor 2. Atherosclerosis. 2011 Feb 1;214(2):345–9.

37. Huang SC-C, Everts B, Ivanova Y, O'Sullivan D, Nascimento M, Smith AM, et al. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. Nat Immunol. 2014 Sep;15(9):846–55.

38. Bossche JV den, Lamers WH, Koehler ES, Geuns JMC, Alhonen L, Uimari A, et al. Pivotal Advance: Arginase-1-independent polyamine production stimulates the expression of IL-4-induced alternatively activated macrophage markers while inhibiting LPS-induced expression of inflammatory genes. J Leukoc Biol. 2012;91(5):685–99.

39. Yurdagul A, Subramanian M, Wang X, Crown SB, Ilkayeva OR, Darville L, et al. Macrophage Metabolism of Apoptotic Cell-Derived Arginine Promotes Continual Efferocytosis and Resolution of Injury. Cell Metab. 2020 Mar 3;31(3):518-533.e10.

40. Yang Libang, Gao Ling, Nickel Thomas, Yang Jing, Zhou Jingyi, Gilbertsen Adam, et al. Lactate Promotes Synthetic Phenotype in Vascular Smooth Muscle Cells. Circ Res. 2017 Nov 10;121(11):1251–62.

41. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. Cell. 2011 Apr 29;145(3):341–55.

42. Tabas I. Cholesterol in health and disease. J Clin Invest. 2002 Sep 1;110(5):583–90.

43. Cui D, Thorp E, Li Y, Wang N, Yvan-Charvet L, Tall AR, et al. Pivotal Advance: Macrophages become resistant to cholesterol-induced death after phagocytosis of apoptotic cells. J Leukoc Biol. 2007;82(5):1040–50.

44. A-Gonzalez N, Bensinger SJ, Hong C, Beceiro S, Bradley MN, Zelcer N, et al. Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. Immunity. 2009 Aug 21;31(2):245–58.

45. Gerbod-Giannone M-C, Li Y, Holleboom A, Han S, Hsu L-C, Tabas I, et al. TNFalpha induces ABCA1 through NF-kappaB in macrophages and in phagocytes ingesting apoptotic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 28;103(9):3112–7.

46. Zelcer N, Tontonoz P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. J Clin Invest. 2006 Mar 1;116(3):607–14.

47. Viaud M, Ivanov S, Vujic N, Duta-Mare M, Aira L-E, Barouillet T, et al. Lysosomal Cholesterol Hydrolysis Couples Efferocytosis to Anti-Inflammatory Oxysterol Production. Circ Res. 2018 May 11;122(10):1369–84.

48. Ouimet M, Franklin V, Mak E, Liao X, Tabas I, Marcel YL. Autophagy Regulates Cholesterol Efflux from Macrophage Foam Cells via Lysosomal Acid Lipase. Cell Metab. 2011 Jun 8;13(6):655–67.

49. Reboldi A, Dang EV, McDonald JG, Liang G, Russell DW, Cyster JG. 25-hydroxycholesterol suppresses interleukin-1-driven inflammation downstream of type I interferon. Science. 2014 Aug 8;345(6197):679–84.

50. Yvan-Charvet L, Bonacina F, Guinamard RR, Norata GD. Immunometabolic function of cholesterol in cardiovascular disease and beyond. Cardiovasc Res. 2019 01;115(9):1393–407.

51. Park D, Han C, Elliott MR, Kinchen JM, Trampont PC, Das S, et al. Continued clearance of apoptotic cells critically depends on the phagocyte Ucp2 protein. Nature. 2011 Aug 21;477(7363):220–4.

52. Kumar A, Gupta P, Rana M, Chandra T, Dikshit M, Barthwal MK. Role of pyruvate kinase M2 in oxidized LDL-induced macrophage foam cell formation and inflammation. J Lipid Res. 2020;61(3):351–64.

53. Weiss-Sadan T, Maimoun D, Oelschlagel D, Kaschani F, Misiak D, Gaikwad H, et al. Cathepsins Drive Anti-Inflammatory Activity by Regulating Autophagy and Mitochondrial Dynamics in Macrophage Foam Cells. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2019;53(3):550–72.

54. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflamasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. Nature. 2010 Apr 29;464(7293):1357–61.

55. Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhelawon B, Carpenter SB, et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating the intracellular nucleation from soluble to particulate ligands in sterile inflammation. Nat Immunol. 2013 Aug;14(8):812–20.

56. Abd-Elrahman I, Meir K, Kosuge H, Ben-Nun Y, Weiss Sadan T, Rubinstein C, et al. Characterizing Cathepsin Activity and Macrophage Subtypes in Excised Human Carotid Plaques. Stroke. 2016 Apr;47(4):1101–8.

57. Sun J, Sukhova GK, Zhang J, Chen H, Sjöberg S, Libby P, et al. Cathepsin L Activity Is Essential to Elastase Perfusion–Induced Abdominal Aortic Aneurysms in Mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 Nov;31(11):2500–8.

58. Kluge MA, Fetterman JL, Vita JA. Mitochondria and Endothelial Function. Circ Res. 2013 Apr 12;112(8):1171–88.

59. Poznyak AV, Ivanova EA, Sobenin IA, Yet S-F, Orekhov AN. The Role of Mitochondria in Cardiovascular Diseases. Biology. 2020 Jun 25;9(6).

60. Boström Pontus, Magnusson Björn, Svensson Per-Arne, Wiklund Olov, Borén Jan, Carlsson Lena M. S., et al. Hypoxia Converts Human Macrophages Into Triglyceride-Loaded Foam Cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Aug 1;26(8):1871–6.

Chapitre IV : Les anticorps

I. Généralités

I. A. Découverte des anticorps

La découverte des anticorps s'est faite progressivement à partir de la fin du 19ème siècle et a été récompensée par de nombreux prix Nobel. A la fin du 19ème siècle, les maladies infectieuses telles que le tétanos et la diphtérie font des ravages. Deux laboratoires se font alors concurrence, celui de Koch à Berlin et celui de Pasteur à Paris. A Berlin, en 1890, Emile von Behring et son collègue Shibasaburo Kitasato démontrent que l'injection de sérum de lapin infecté par *Clostridium tetani* (bactérie responsable du tétanos) à des souris confèrent à celles-ci une protection contre une infection avec cette même bactérie (1,2). En parallèle, en France dans le laboratoire de Pasteur, Emile Roux et Alexandre Yersin, après avoir caractérisé la toxine diphtérique en 1888, utilisent les chevaux pour produire l'immun-sérum nécessaire pour leur test sur des centaines d'enfants atteints de la diphtérie. Von Behring a ensuite appliqué cette technique au traitement de la diphtérie chez des enfants, ce qui lui a valu, ainsi qu'à Kitasato, le premier prix Nobel de médecine en 1901. Cette production à grande échelle a également permis de fournir l'immun-sérum anti-tétanique nécessaire pour soigner les soldats lors de la première guerre mondiale. En parallèle, Paul Ehrlich, dans le laboratoire de Koch, travaille sur l'étude fondamentale de l'immunité dans les infections. Il considère que les toxines stimulent la production d'anticorps dans le sérum et que ces anticorps sont spécifiques de chaque toxine (3). Cette découverte, à l'origine de la vaccination, lui vaut, en 1908, le prix Nobel de médecine en association avec Elie Metchnikoff sur ses travaux sur la phagocytose et les macrophages. Quelques années plus tard, ce sont les travaux sur la découverte du complément qui valent un nouveau prix Nobel de médecine, cette fois à Jules Bordet en 1919. Puis, dans les années 40, Astrid Frageus et Max Cooper découvrent que les anticorps sont produits par les plasmocytes, dérivés des lymphocytes B. La structure chimique des anticorps est ensuite découverte grâce à la cristallographie aux rayons X dans les années 50 indépendamment par deux chimistes Rodney Porter et Gerald Edelman qui ont reçu le prix Nobel en 1972 (4).

I. B. Structure et fonctions des anticorps

I. B. 1) Structure de base

Les anticorps sont des glycoprotéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Ils sont constitués de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes identiques d'environ 450 acides aminés (50kDa) nommées « chaînes lourdes » (H pour *heavy*), et deux chaînes identiques d'environ 220 acides aminés (25kDa) appelées « chaînes légères » (L pour *light*) (Figure 33). Les deux chaînes lourdes sont reliées entre elles par des ponts disulfures et des interactions non covalentes (liaisons hydrogènes, ioniques, hydrophobes). De la même manière, chaque chaîne légère est reliée à une chaîne lourde. Chaque chaîne lourde et chaque chaîne légère possèdent en partie N-terminale une région dite variable, composée d'un domaine variable noté VH ou VL, et en partie C-terminale une région dite constante, constituée de trois à quatre domaines constants (CH1, CH2, CH3 et CH4) pour la chaîne lourde ou d'un domaine constant (CL) pour la chaîne légère. L'association de la chaîne légère avec les domaines CH1 et VH des chaînes lourdes forme le fragment variable Fab (*fragment antigen binding*) tandis que l'association des domaines CH2 et CH3 des deux chaînes lourdes forme le fragment cristallisable Fc.

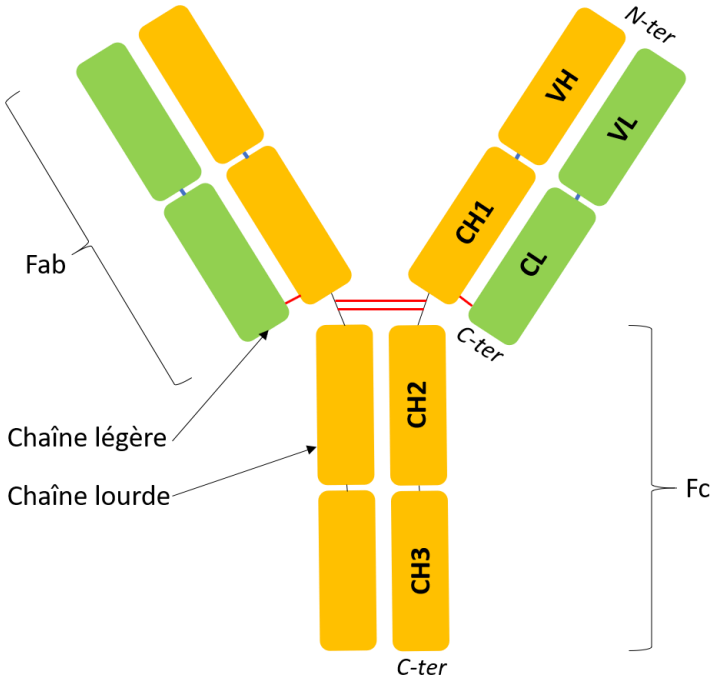


Figure 33 : Représentation schématique d'une immunoglobuline de type IgG. Les deux chaînes lourdes (en jaune) sont reliées entre elles par deux ponts disulfures au niveau de la zone charnière, et aux chaînes légères (en vert) par un seul pont disulfure entre le CH1 et le CL. Chaque chaîne est composée de domaines : pour la chaîne lourde, VH et CH1 formant le Fab et CH2 et CH3 formant le fragment Fc. La chaîne légère est constituée de deux domaines, CL et VL. La partie variable de l'Ig est l'association des domaines VH et VL.

I. B. 2) Domaines constants

Les domaines constants constituent les propriétés effectrices des anticorps. Le fragment Fc est impliqué dans trois voies de destruction de pathogènes :

- La CDC (*complement dependant cytotoxicity*) est la cytotoxicité dépendante du complément. Lors de la formation du complexe immun, le complément va se fixer sur le fragment Fc et induire la lyse du pathogène (voie classique d'activation du complément).

- L'ADCP (*antibody dependant cellular phagocytosis*) est la phagocytose dépendante des anticorps. Le complexe immun est reconnu par les cellules possédant le récepteur au fragment Fc, qui vont ensuite phagocyter et donc détruire le complexe immun.

- L'ADCC (*antibody dependant cell-mediated cytotoxicity*) est la cytotoxicité médiée par les cellules et dépendante des anticorps. Après fixation des immuns complexes sur le récepteur Fc des cellules NK, celle-ci vont éjecter leurs granules cytotoxiques détruisant ainsi le pathogène.

Le fragment Fc est également responsable du recyclage des anticorps. Lors de la phagocytose, les anticorps sont liés d'une part à l'élément à dégrader (pathogène, cellule morte, cellule modifiée) et d'autre part à leur récepteur cellulaire, le FcRn (*neonatal Fc receptor*). Sous l'action du pH acide des lysosomes formés, les anticorps vont se détacher du FcRn et être libérés hors de la cellule lorsque le phagolysosome va fusionner avec la membrane plasmique, et ainsi ne pas être dégradés. Les anticorps entiers ont une demi-vie allant de 5 à 20 jours.

I. B. 3) Domaines variables

Les domaines variables constituent les propriétés de reconnaissance des anticorps. Chaque domaine variable est composé de trois régions constituées de séquences en acides aminés très variables, ce sont les régions hypervariables (Figure 34). Les trois régions hypervariables du domaine VH et les trois régions hypervariables du domaine VL constituent le paratope, complémentaire de l'épitope de l'antigène, c'est pourquoi on les appelle aussi CDR (*complementarity determining regions*). Les segments reliant les CDR entre eux sont appelés FR (*framework region*), ou région charpente, et présentent une plus faible variabilité.

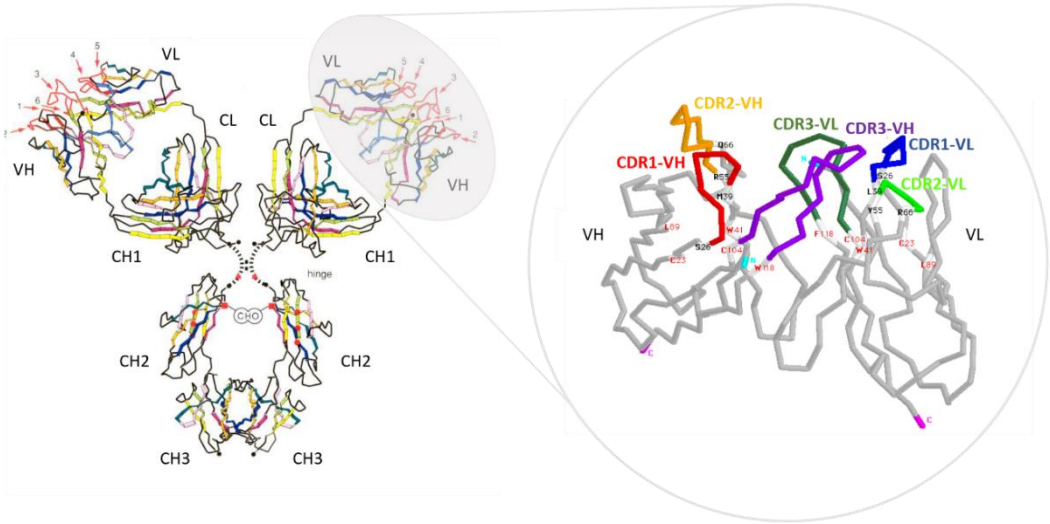


Figure 34 : Représentation des régions hypervariables. A partir de Winter, G. & Milstein. C., Nature, 1991, et IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®.

I. B. 4) Différentes classes d'immunoglobulines

L'association d'une chaîne lourde avec une chaîne légère forme un complexe H-L qui, lorsqu'il est associé avec un deuxième complexe H-L, forme une Ig de base à quatre chaînes notée $(H_2L_2)n$ avec n allant de 1 à 5 selon la classe d'Ig. Chez l'Homme, il existe cinq classes d'Ig (IgM, IgA, IgE, IgD et IgG) avec 6 sous-classes en fonction du type de la chaîne lourde : IgM (μ), IgA (α1 et α2), IgE (ε), IgD (δ) et IgG (γ1, γ2, γ3 ou γ4) (Tableau 4).

Tableau 4 : Différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines (Ig)

Type d'Ig	IgG1 IgG2 IgG3 IgG4	IgD	IgM	IgA1 IgA2	IgE
Conformation	Monomères	Monomères	Pentamères	80% dimères 20% monomères	Monomères
% du total des Ig	75%	<1%	10%	15-20%	<0,01%
Localisation et fonctions	Sang, réponse secondaire, immunités à long terme et fœtale	Sang, réponse primaire	Sang, réponse primaire	Sécrétions muqueuses, immunité locale	Tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, Immunité antiparasitaire, allergies

Concernant les chaînes légères, il en existe deux types, κ et λ. Un seul type de chaine légère se retrouve sur un anticorps, et chez l'Homme on retrouve environ 60% d'anticorps possédant la chaîne κ et 40% la chaîne λ. Le poids moléculaire total de l'Ig de type IgG est de 150kDa, dont 25kDa pour la chaîne légère et 50kDa pour la chaîne lourde. Les immunoglobulines peuvent posséder un ou plusieurs paratopes, on dit alors qu'elles sont monovalentes ou multivalentes. Cela permet d'augmenter la probabilité de fixation et de cibler plusieurs fois le même récepteur. Cette notion est appelée la valence. Par exemple, une IgM a une valence 5 fois supérieure à celle des autres types d'immunoglobulines.

I. C. Diversité des anticorps

Contrairement aux macrophages qui font partie de l'immunité innée, comme nous l'avons vu dans le chapitre II, les lymphocytes B font partie de l'immunité adaptative. Tandis que l'immunité innée a pour rôle de détruire les pathogènes en utilisant un nombre restreint de récepteurs, la capacité de reconnaissance spécifique mise en jeu dans l'immunité adaptative est très largement plus importante du fait de la multitude des immunorécepteurs, TCR (*T Cell Receptor*) et BCR (*B Cell receptor*), présents à la surface des lymphocytes T et B. La grande diversité des anticorps produits vient de 1) la multitude des fragments géniques codant pour les chaînes lourdes et légères qui peuvent être recombinés de manière aléatoire, un mécanisme appelé recombinaison génique lors duquel la liaison de deux segments fait également intervenir des enzymes qui 2) vont rajouter une seconde source de diversité que l'on nomme « flexibilité jonctionnelle » par l'ajout d'acides nucléiques complémentaires ou au hasard, de 3) l'association d'une chaîne lourde avec une chaîne légère ; ces trois mécanismes ont lieu lors de la maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse. Enfin Dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques, TLAM…), s'ajoute à cela, une 4ème source de diversité des anticorps, lors de l'activation des lymphocytes B par leur Ag : Il s'agit de mutations, dans les séquences nucléiques des régions Hypervariables des anticorps, appelées hypermutations somatiques (HMS). Cela donne une diversité de l'ordre de 10^{12} anticorps différents donnant ainsi un répertoire capable de reconnaître un très grand nombre d'antigènes différents. La diversité des anticorps repose donc sur la recombinaison génique, la combinaison aléatoire des chaînes lourdes et légères, la flexibilité jonctionnelle et les hypermutations somatiques.

I. C. 1) Diversité génique

La diversité génique est liée au fait que les Ig sont codées par plusieurs familles multigéniques : V (*Variable*), D (*Diversity*) et J (*Joining*). C'est l'association d'un gène V avec un gène J qui constitue la chaîne légère et l'association d'un gène V, d'un gène D et d'un gène J qui forme la chaîne lourde. Un

premier facteur de diversité est donc l'association aléatoire de ces gènes, d'autant plus qu'il existe de nombreux gènes (V, et J) et (V, D et J) pour les chaînes légères κ et λ et pour les chaînes lourdes, respectivement (Tableau 5). Ce qui donne environ 6300 combinaisons possibles pour les gènes codant pour la chaîne lourde et environ 160 et 135 combinaisons pour les gènes codant pour les chaînes κ et λ respectivement.

Tableau 5 : Nombre de gènes V, D et J codant pour les chaînes légères κ et λ, et pour les chaînes lourdes. Données issues du site http://www.imgt.org/IMGTeducation/.

	Gènes V	Gènes D	Gènes J
chaîne légère κ	31-35	-	5
chaîne légère λ	29-33	-	4-5
chaîne lourde	38-46	23	6

I. C. 2) Diversité combinatoire : production par les lymphocytes B

Les lymphocytes B commencent leur maturation dans la moelle osseuse indépendamment de l'antigène (Figure 36A). C'est lors de cette maturation que vont avoir lieu les réarrangements des gènes codants pour le BCR (*B-cell Receptor*) (locus IGH pour la chaîne lourde, et IGK ou IGL pour la chaîne légère), soit sur le chromosome paternel, soit sur le chromosome maternel, sous l'action des recombinases RAG-1 et RAG-2 (Figure 35). Le premier réarrangement a lieu entre un gène DH (gène de diversité de la chaîne lourde) et un gène JH (gène de liaison de la chaîne lourde), avec élimination de l'ADN intermédiaire. Le second réarrangement s'effectue entre ce réarrangement DH-JH et un gène VH (gène de variabilité de la chaîne lourde) avec élimination de l'ADN intermédiaire. Cela donne un segment DH-JH-VH codant pour la partie variable de la chaîne lourde, associé aux gènes codant pour la partie constante de la chaîne lourde, qui est ensuite transcrit en ARN pré-messager. L'épissage de celui-ci aboutit à un ARN messager mature qui est traduit en une chaîne polypeptidique (Figure 35A). Un test de fonctionnalité de cette chaîne lourde nouvellement synthétisée va être réalisé via son association avec une pré-chaîne légère. Si la chaîne lourde est fonctionnelle, la cellule va stopper le réarrangement sur le locus de l'autre allèle et poursuivre la maturation de la chaîne légère. Les réarrangements sur le locus de la chaîne légère se font de manière similaire à la chaîne lourde. Un réarrangement entre un gène VL (gène de variabilité de la chaîne légère) et JL (gène de liaison de la chaîne légère) est effectué formant un gène codant pour le domaine variable de la chaîne légère, associé au gène codant pour le domaine constant de la chaîne légère. Ce réarrangement est ensuite transcrit en ARN pré-messager, puis épissé en ARN messager mature, et enfin, traduit en une chaîne

polypeptidique (Figure 35B). Les chaînes polypeptidiques correspondant à la chaîne lourde et à la chaîne légère sont associées aléatoirement pour former une IgM ou une IgD. Les 6300 combinaisons possibles de la chaîne lourde associées aux 200 combinaisons possibles de la chaîne légère portent le nombre de combinaisons possibles à environ 1,3 millions d'immunoglobulines différentes.

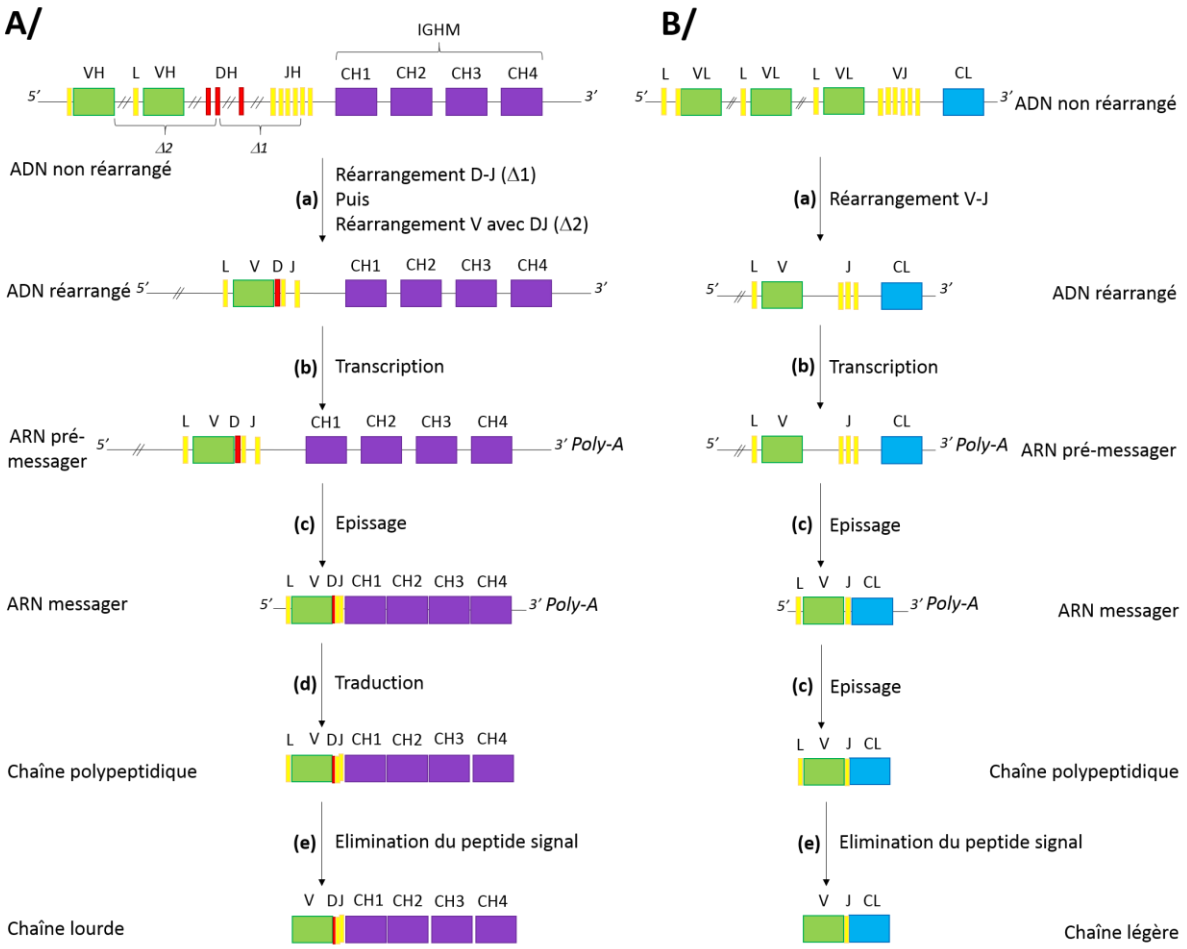


*Figure 35 : Synthèse d'une chaîne lourde (A) et d'une chaîne légère (B) d'une immunoglobuline. Inspiré du site http://www.imgt.org/IMGTeducation/. **A** (a) Concernant la synthèse d'une chaîne lourde, deux réarrangements ont lieux. Un premier entre un gène DH et un gène JH puis un second entre un gène VH et le réarrangement DH-JH. L'ADN intermédiaire est délété. (b) La transcription du réarrangement et du gène IGHM donne un ARN pré-messager IGHV-D-J-M. (c) Cet ARN pré-messager est épissé en ARN messager mature (d) lequel est ensuite traduit en une chaîne polypeptidique. (e) Le peptide signal est éliminé et une chaîne lourde est produite. **B** (a) Concernant la synthèse d'une chaîne légère, un réarrangement a lieu entre un gène VL et un gène JL. (b) La transcription du réarrangement et du gène IGKC donne un ARN pré-messager IGKV-J-C. (c) Cet ARN pré-messager est épissé en ARN mature (d) lequel est ensuite traduit en une chaîne polypeptidique. (e) Le peptide signal est éliminé et une chaîne légère mature est générée. (L pour Leader).*

Une fois ces réarrangements terminés, un lymphocyte B naïf, exprimant à sa surface une IgM et une IgD (que l'on appelle alors BCR (récepteur des lymphocytes B), est produit (Figure 36A). Celui-ci va migrer dans la circulation sanguine vers les organes lymphoïdes secondaires (Figure 36B). Le BCR pourra alors reconnaître son antigène spécifique. En parallèle, la coopération avec les lymphocytes T va activer le lymphocyte B, qui va se mettre à proliférer et à se différencier en plasmocyte pour sécréter de grandes quantités d'IgM (ou d'IgG, IgE, IgA par commutation isotypique). Le lymphocyte B activé va

également se différencier en lymphocyte B mémoire, ce qui constitue une banque de BCR ayant déjà rencontré leur antigène, permettant ainsi une élimination plus rapide de l'antigène lors d'une infection ultérieure.

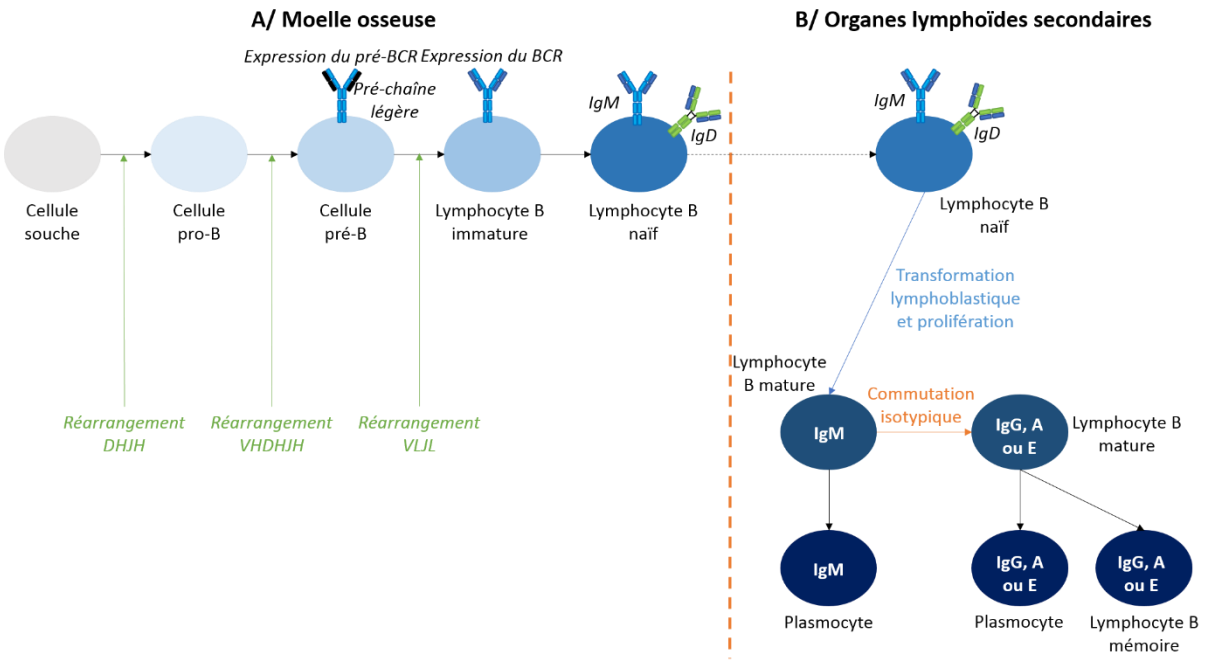


Figure 36 : Lymphopoïèse et production d'anticorps. La maturation du lymphocyte B naïf à partir d'une cellule souche se fait dans la moelle osseuse indépendamment de la présence de l'antigène. Pendant cette maturation se déroule le réarrangement des gènes VDJ codant pour le BCR. La première recombinaison entre un gène DH et un gène JH donne une cellule pro-B. L'assemblage de la chaîne lourde fait suite au réarrangement entre la recombinaison DH-JH et le gène VH, ce qui donne une cellule pré-B. L'expression du pré-BCR est permise grâce à l'association avec une pré-chaîne légère donnant un signal de survie pour cette cellule et déclenche le réarrangement de la chaîne légère. La pré-chaîne légère est donc remplacée par une chaîne légère après réarrangement entre un gène VL et un gène JL, donnant un lymphocyte B immature. Le lymphocyte B naïf est obtenu lorsqu'il présente à sa surface une IgM et une IgD. Il va ensuite quitter la moelle osseuse et rejoindre les organes lymphoïdes secondaires où il va rentrer en contact avec son antigène. Cette liaison va induire la prolifération et la différenciation du lymphocyte B naïf en lymphocyte B mature puis en plasmocyte sécréteur d'IgM. Une commutation isotypique peut avoir lieu à partir du lymphocyte B mature aboutissant à la différenciation en plasmocyte sécréteur d'IgG, IgA et IgE, et en lymphocytes B mémoire.

I. C. 3) Flexibilité jonctionnelle et hypermutations somatiques

Deux autres facteurs de diversité existent, impliquant des changements au niveau de la séquence ADN, qui sont la flexibilité jonctionnelle et les hypermutations somatiques. La flexibilité jonctionnelle a lieu lors des processus de réarrangement des gènes V, D et J (Figure 36A). Ce sont les mécanismes de réparation de l'ADN qui peuvent insérer ou supprimer des nucléotides dans les zones de jonction entre les gènes, aboutissant à une modification de la chaîne polypeptidique finale. Les hypermutations somatiques, elles, ont lieu après les réarrangements, lorsque les lymphocytes B naïfs sont dans les organes lymphoïdes secondaires et sont activés par un antigène (Figure 36B). Elles sont réalisées par la cytidine désaminase sur la séquence nucléique au niveau des CDR 1, 2 et 3 des domaines VH et VL à une fréquence de 10^{-3} à 10^{-4} mutation par base et par génération cellulaire. Cela a pour conséquence

de modifier l'affinité des BCR. Les cellules B présentant une affinité améliorée pour l'antigène seront sélectionnées positivement et seront amplifiées (issus de http://www.imgt.org/IMGTeducation/).

II. Les anticorps comme outils

Même si les anticorps ont été découverts dès la première moitié du 20ème siècle et que les thérapies par injections d'immunsérums (sérothérapie) ont pu soigner de nombreuses maladies à cette époque (diphtérie, tétanos), l'utilisation thérapeutique des anticorps a peu à peu été délaissée au profit des antibiotiques (sulfamides, pénicilline), ces derniers étant beaucoup plus simples à produire que les immunsérums et plus facilement utilisables par les patients (5). En 1975, Georges Köhler et César Milstein ont mis au point une nouvelle technique dans le but de faciliter la production des anticorps : la technologie des hybridomes. Cette technologie permet d'immortaliser des lymphocytes B, isolés de la rate d'un animal immunisé avec un Ag donné, en les faisant fusionner avec une cellule tumorale (une cellule de myélome c'est-à-dire un lymphocyte B cancéreux). Cette immortalisation permet de faire sécréter indéfiniment des anticorps d'un clone de lymphocyte B donné. Les anticorps produits par un clone d'hybridome donné sont appelés « anticorps monoclonaux » (contrairement aux anticorps polyclonaux retrouvés dans les immunsérums qui proviennent de plusieurs clones de lymphocytes B). Les clones sécrétant des anticorps monoclonaux spécifiques de l'antigène d'intérêt sont sélectionnés et conservés pour une production ultérieure à grande échelle (6). Après immunisation d'un animal ou d'un patient avec un antigène cible, les lymphocytes B sont récupérés de la rate et fusionnés avec une cellule tumorale. Les clones des cellules hybrides (hybridomes) produisant les anticorps spécifiques de l'antigène d'intérêt sont sélectionnés, amplifiés et produits à grande échelle (Figure 37). Cette technologie a révolutionné la recherche en biologie par le développement d'anticorps monoclonaux spécifiques d'antigènes humains après immunisation d'un animal (le plus souvent des souris, rats et lapins). La technologie des hybridomes a toutefois montré ses limites en thérapie du fait d'une forte immunogénicité due à l'origine (murine par exemple) de ces anticorps ou en raison de la faible immunogénicité de certaines protéines, ou à l'impossibilité d'immuniser des modèles animaux contre des protéines toxiques. Les progrès technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis de répondre à ces problématiques en diminuant l'immunogénicité des anticorps et en donnant la possibilité d'obtenir des anticorps contre tout type d'antigène. Ces progrès en ingénierie moléculaire ont permis aux anticorps monoclonaux de revenir des acteurs primordiaux tant en thérapie, pour laquelle ils représentent aujourd'hui une alternative pertinente dans la plupart des domaines médicaux, que dans le domaine de la recherche fondamentale, puisqu'ils continuent à

servir d'outils précieux dans des études mécanistiques permettant de répondre à une grande variété de questions biologiques.

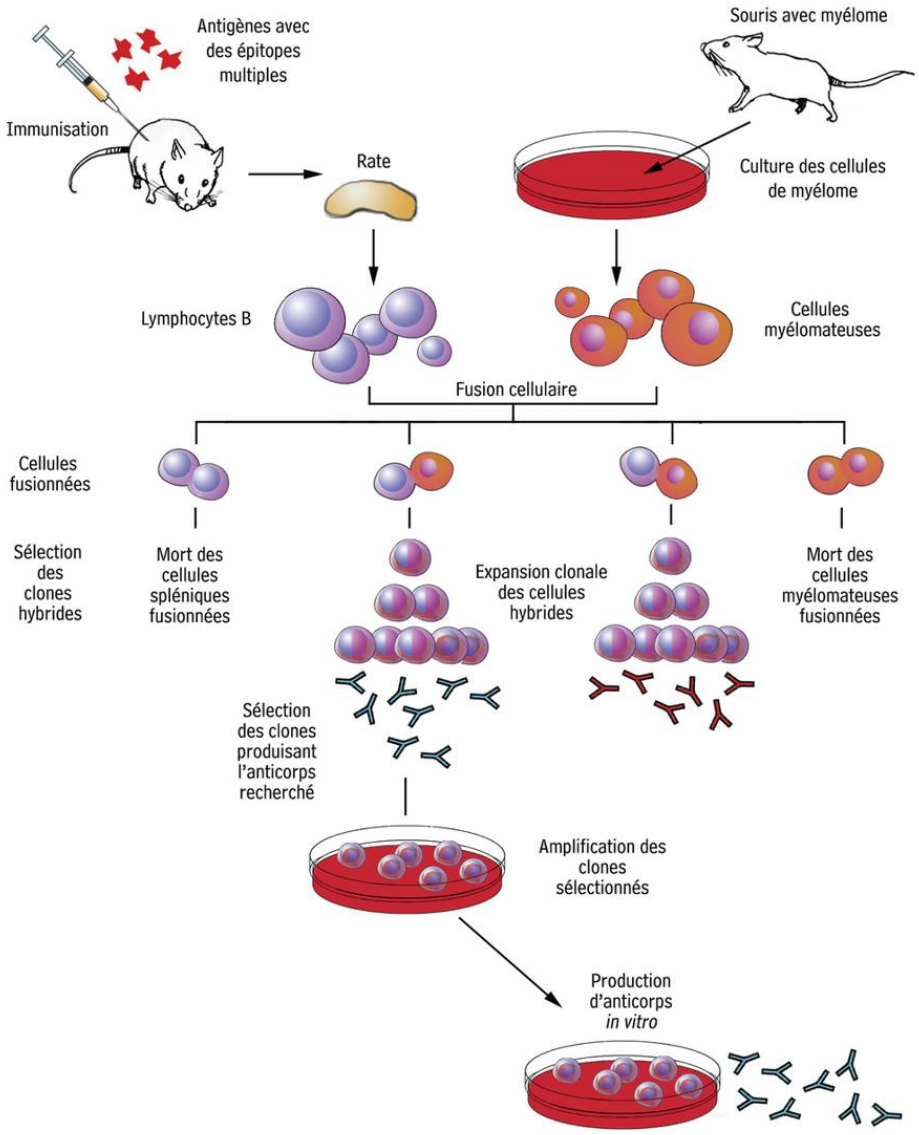


Figure 37 : Technique de mise au point des hybridomes. Adapté d'après le site www.lookfordiagnosis.com.

II. A. Ingénierie des anticorps

Les progrès en ingénierie moléculaire ont permis de moduler les propriétés structurales et/ou fonctionnelles des anticorps : immunogénicité, affinité, spécificité, stabilité et pharmacocinétique afin de les adapter à la question biologique.

II. A. 1) Humanisation des anticorps

Le problème rencontré dans la sérothérapie du début du 20ème siècle et dans la technique des hybridomes, c'est que les anticorps étrangers à l'organisme sont reconnus comme tels et détruits par les cellules de l'hôte ce qui diminue l'efficacité du traitement. Afin de diminuer cette immunogénicité, les anticorps ont été progressivement humanisés : il y a eu les anticorps chimériques (seule la partie variable est murine) puis les anticorps humanisés (seuls les CDR sont murins) et enfin les anticorps totalement humains, respectivement identifiables via les suffixes -ximab, -zumab et -(m)umab (Figure 38).

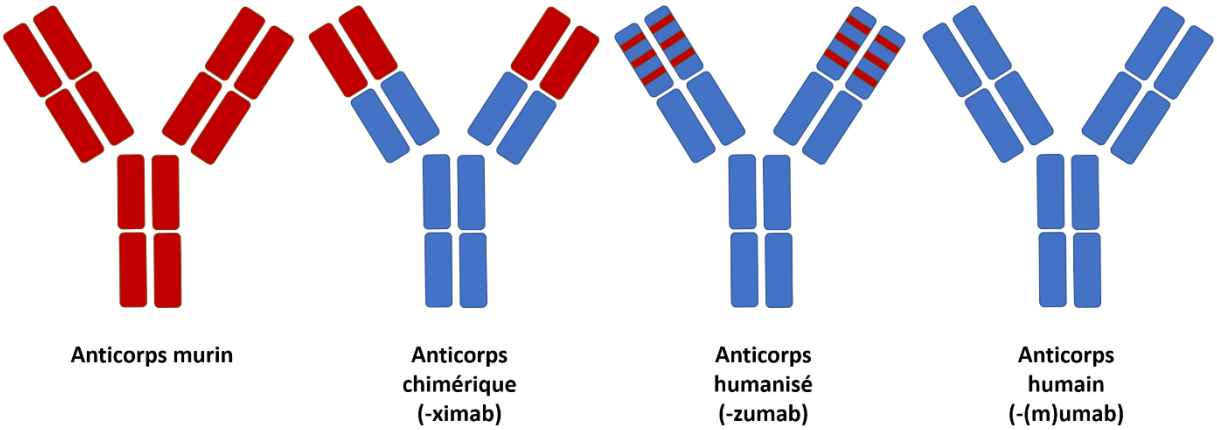


Figure 38 : Humanisation des anticorps. Les anticorps chimériques possèdent une partie constante humaine (en bleu) et une partie variable murine (en rouge). Les anticorps humanisés ont seulement les CDR murins. Les anticorps humains possèdent une partie constante et un partie variable humaines (en bleu).

II. A. 2) Les différents formats

Les anticorps peuvent être reformatés en différents fragments d'anticorps de deux manières, soit par voie enzymatique, soit par ingénierie moléculaire. La digestion enzymatique d'une IgG entière par la papaïne donne deux fragments Fabs et un fragment Fc, tandis que la digestion par la pepsine donne un fragment Fab'_2. L'ingénierie, quant à elle, permet de composer artificiellement une palette de formats beaucoup plus grande (Figure 39). Par ailleurs, il existe des formats d'immunoglobulines non usuels retrouvés chez les chameaux et les requins, où un seul domaine variable est responsable de la liaison à l'antigène. Les immunoglobulines de chameau sont composées de deux chaînes possédant deux domaines constants et un domaine variable (VhH). Les Ig de requin (Ig-NARs) sont constituées de deux chaînes de cinq domaines constants et un domaine variable (V-NAR).

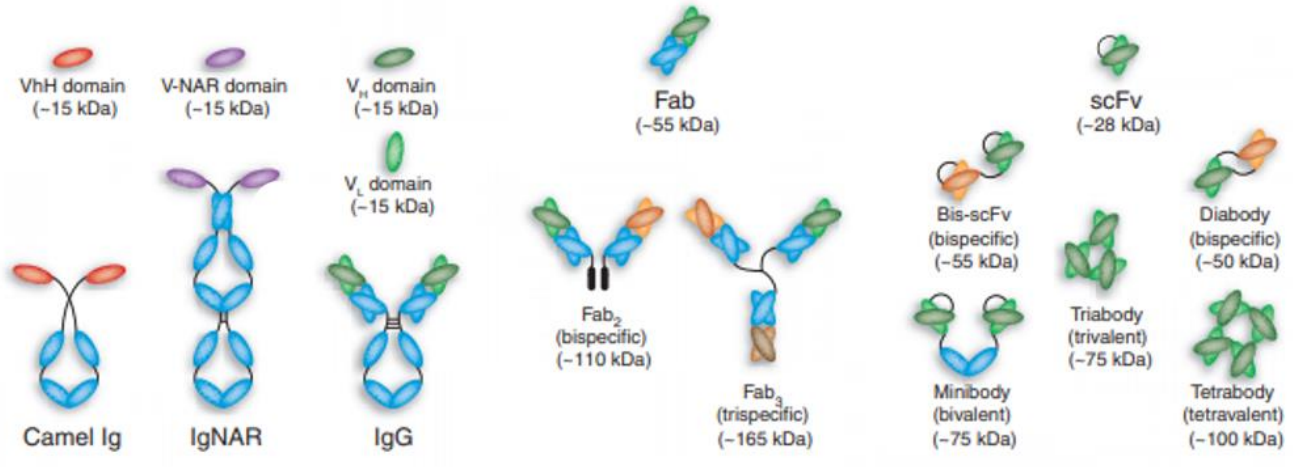


Figure 39 : Représentation des différents formats de fragments d'anticorps thérapeutiques. Issu de Holliger, et al, Nat.Biotechnol. 2005. La digestion enzymatique (papaïne et pepsine) d'une IgG entière donne les fragments Fab et Fab'$_2$ respectivement. Le fragment scFv est constitué d'un VH et d'un VL reliés par un lien peptidique nommé « linker » d'une quinzaine d'acides aminés. Les immunoglobulines de chameau (camel Ig) sont composées de deux chaînes possédant deux domaines constants et un seul domaine variable (VhH). Les immunoglobulines de requin (Ig-NARs) sont constituées de deux chaînes de cinq domaines constants et un seul domaine variable (V-NAR). A partir de ces « blocs » de base, de nombreux autres formats peuvent être obtenus selon les besoins. Cette liste est non exhaustive à cause de la multitude de combinaisons possibles.

En fonction de la question biologique, les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques des anticorps peuvent être modifiées. Par exemple, il est possible d'agir sur la durée de vie d'un anticorps. La pharmacocinétique d'un anticorps dépend à la fois de sa taille et de la présence du fragment Fc. Pour diminuer la durée de vie de l'anticorps dans l'organisme, le fragment constant Fc peut être modifié ou supprimé. Un fragment d'anticorps de type Fab a, par exemple, une demi-vie allant de 2 à 4h, à comparer avec la demi-vie d'une Ig entières de 5 à 20 jours. Pour diminuer encore cette durée, les parties constantes peuvent être enlevées, il reste alors seulement les domaines variables reliés entre eux par un lien peptidique d'une quinzaine d'acides aminés (linker), formant un fragment d'anticorps que l'on appelle scFv (*single-chain Fragment variable*). La faible demi-vie des scFvs et des Fabs est due au fait qu'ils sont éliminés par les reins car leur taille est inférieure au seuil de filtration glomérulaire (60kDa) (7). La diminution de la demi-vie peut être requise dans le cas de traitements locaux, de courte durée, avec une cible particulière (à l'intérieur de certains tissus) ou ne nécessitant par l'action du Fc, comme pour l'imagerie. Il est possible d'agir également sur l'avidité d'un fragment en jouant sur le nombre de paratope. Par exemple, les scFvs peuvent être liés par deux, formant un bi-scFv (ou diabody selon le mode d'assemblage), ou par trois, formant un triabody. Il est même possible de modifier la spécificité en assemblant des scFvs ou Fabs de reconnaissance antigénique différente. Ainsi, des Fabs, ou scFvs, bi- ou tri-spécifiques peuvent être obtenus, permettant de cibler différents biomarqueurs et, par exemple, de faire coopérer plusieurs cellules. En cancérologie cette technique est largement utilisée, en permettant de relier les cellules cancéreuses aux lymphocytes T cytotoxiques, ils sont appelés « BiTE » (*bispecific T-cell engager*) (8). Par exemple le blinatumomab permet de relier les cellules B malignes aux lymphocytes T cytotoxiques, et a montré une activité anti-

leucémique (9). L'utilisation des domaines de type VhH et V-NAR fournissent des alternatives thérapeutiques intéressantes car ils présentent à la fois une petite taille et une forte affinité, supérieure aux anticorps humains (10). Toutes ces modifications peuvent être combinées entre elles, ce qui aboutit à cette multitude de formats possibles (11,12).

II. A. 3) Phage-display

Une technique alternative aux hybridomes permettant de générer des anticorps monoclonaux a été développée dans les années 90 par l'équipe de McCafferty (13) : le phage-display. Cette présentation de protéines à la surface de phages est devenue un outil très puissant de sélection. Les phages, que l'on appelle filamenteux, peuvent présenter à leur surface des peptides, des protéines ou encore des fragments d'anticorps fusionnés à une des protéines de la capside du phage. Une application importante de la technique de phage-display est la construction de banques combinatoires de fragments d'anticorps pour la production d'anticorps monoclonaux (14,15). En effet, la technologie de présentation via les phages filamenteux a été développée pour palier le gros désavantage de la production d'anticorps monoclonaux par les hybridomes, qui est le prélèvement des lymphocytes B d'un animal ou patient pour un antigène donné. De plus, le système de banques combinatoires a également permis de produire des anticorps pour lesquels l'immunisation s'avérait impossible. Dans la suite de ce chapitre, seules les banques humaines seront évoquées. Le Tableau 6 ci-dessous récapitule les avantages et inconvénients de ces deux techniques majeures.

Tableau 6 : Comparaison entre la technologie des hybridomes et celle du phage-display. Adapté de NH Hairul Bara et al. Biologicals 2013

	HYBRIDOMES	**PHAGE-DISPLAY**
HOTE ANIMAL	requis	Non requis
PRODUCTION	En intrapéritonéale	En système bactérien
ANTICORPS CONTRE LES TOXINES	Impossible	Possible
ANTICORPS CONTRE DES ANTIGENES CONSERVES	Impossible	Possible
MATURATION DE L'AFFINITE	*In vivo*	*In vitro*
LIMITATIONS THERAPEUTIQUES	Réactions d'immunogénicité contre les anticorps de souris	Aucune
CONDITIONS DE SELECTION	Peu de contrôle sur les anticorps produits	Contrôle précis
INGENIERIE	Impossible	Manipulation des gènes codant pour les anticorps

II. A. 3) a) Principe

Le phage display est une technique extrêmement puissante car il génère un lien physique entre une protéine et son gène, permettant ainsi d'avoir accès au gène codant la protéine. Autre avantage technique, les particules phagiques en raison de leur petite taille, peuvent être présentes à un taux supérieur de 10^{12} particules dans 1 ml de solution et permettre ainsi la sélection d'un grand nombre de particules différentes par tour. La technologie phage-display comprend donc quatre étapes principales pour produire des anticorps monoclonaux (de type scFv ici) : (1) la construction de banques, (2) la sélection de phage-scFvs ciblant la protéine d'intérêt, (3) le criblage des phage-scFvs spécifiques et (4) la production à grande échelle.

Les techniques de biologie moléculaire permettent aujourd'hui d'amplifier facilement les gènes variables d'immunoglobulines à partir de l'ARNm des lymphocytes B et de les cloner en les combinant aléatoirement pour générer des banques de grande diversité. Il existe différents types de banques qui diffèrent par la provenance des gènes variables d'immunoglobulines. On distingue ainsi des banques naïves, immunes, semi-synthétiques et synthétiques. Les banques naïves et immunes sont construites à partir des lymphocytes B de patients (non immunisés pour les naïves, et immunisés pour les banques immunes) dans lesquels on isole les gènes codants pour les VH et VL des immunoglobulines avant de les cloner aléatoirement pour former les banques. L'avantage des banques naïves est qu'elles permettent de sélectionner des anticorps contre un large panel d'antigènes. Cependant, les anticorps sont moins affins que ceux obtenus dans les banques immunes. L'avantage des banques immunes est d'avoir *in fine* un enrichissement en anticorps spécifiques d'un antigène donné présentant des affinités élevées pour cet antigène. Il est également possible de synthétiser des banques de manière semi-synthétique. L'idée est de garder la charpente de la partie variable (les FR) et de modifier génétiquement les CDR par introduction de mutations aléatoires. C'est le cas pour la banque de Pierre Martineau, *et al*, dans laquelle les mutations aléatoires ont été réalisées dans les régions VH-CDR3 et VL-CDR3 (16). Les banques synthétiques, quant à elles, sont obtenues à partir de mutations aléatoires sur la totalité des gènes VH et VL.

Trois partenaires majoritaires sont impliqués dans la sélection par phage-display : (1) le phage filamenteux (qui exprime à sa surface le fragment d'anticorps), (2) le phagemide recombinant (possédant le gène codant pour le fragment d'anticorps) et (3) la bactérie recombinante (qui produit les phage-scFvs à partir du phagemide).

II. A. 3) b) Le phage M13

Le phage filamenteux M13 fait partie du groupe II du type *Virus*, famille des *Inoviridae*, genre *Inovirus*. Il est non lytique et capable d'infecter les bactéries *gram(-)* du type *E. Coli*. Son génome est de type ADN simple brin circulaire de 6,5kb codant pour dix protéines, dont cinq formants la capside du phage (P3, P6, P7, P8 et P9) (Figure 40).

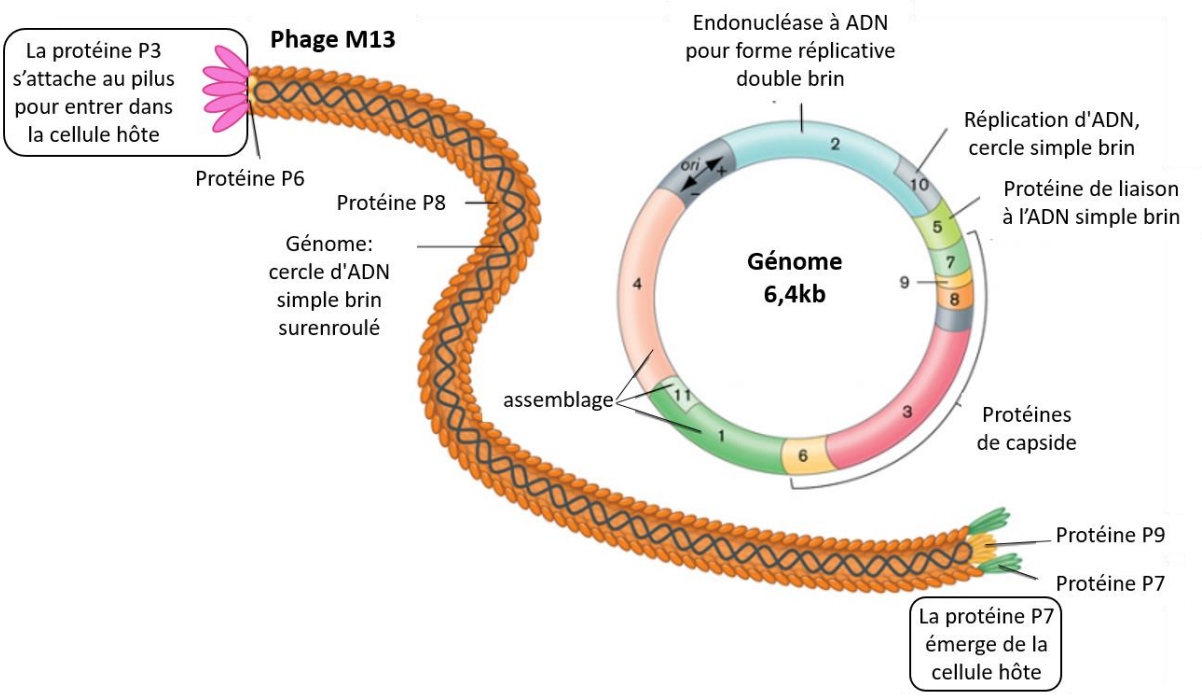


Figure 40 : Structure du phage M13 et son génome. Inspiré de http://www.wwnorton.com/college/biology/microbiology2/ch/11/etopics.aspx. Les dix protéines codées par le génome du phage sont numérotées. Les couleurs du génome correspondent aux couleurs des protéines de la structure du phage.

La protéine P8 est la protéine majoritaire (plus d'un millier de copies) car elle forme le pourtour de la capside. Les quatre autres protéines sont la P6 et la P3 d'un côté et la P7 et la P9 de l'autre, chacune présente en cinq exemplaires. La P3 est responsable de l'accroche du phage au pilus pour entrer dans la cellule hôte, et est reliée à la capside par la P6. P3 est également responsable de l'expression du scFv avec lequel elle est fusionnée. P7 et P9 constituent l'autre extrémité du phage. Les protéines P2, P5 et P10 sont responsables de la réplication et les protéines P1 et P4 de l'assemblage.

II. A. 3) c) Les phagemides

Un phagemide est un plasmide dans lequel a été ajoutée une origine de réplication du phage M13. Il possède donc deux origines de réplication, celle du phage (M13 ori) et une bactérienne (ColE1 ori). Les gènes codant pour le scFv sont insérés en aval du gène codant pour la protéine P3. L'ensemble des phagemides est ensuite transfecté dans les bactéries pour constituer les banques combinatoires (Figure 41.(1)). La production des phages recombinants est basée sur l'infection des bactéries recombinantes par des phages auxiliaires qui vont fournir le matériel nécessaire à l'encapsidation des phagemides (Figure 41.(2)) pour la production de nouveaux virions (Figure 41.(3)). Ces nouveaux virions vont exprimer à la fois la P3 fusionnée au scFv mais également la P3 fonctionnelle (ou sauvage). Cependant, la proportion n'est pas égale, mais plutôt de l'ordre de 90% de P3 sauvage. Une alternative a été développée par Rondot, *et al* pour n'avoir que des copies de P3 fusionnées au scFv. Il a mis au point un phage auxiliaire, nommé hyperphage, possédant les mêmes caractéristiques que le phage M13 sauf le gène codant pour P3 qui a été délété. De cette façon, la bactérie n'aura d'autre choix que d'utiliser la version de P3 fusionnée au scFv présente dans le phagemide (Figure 41).

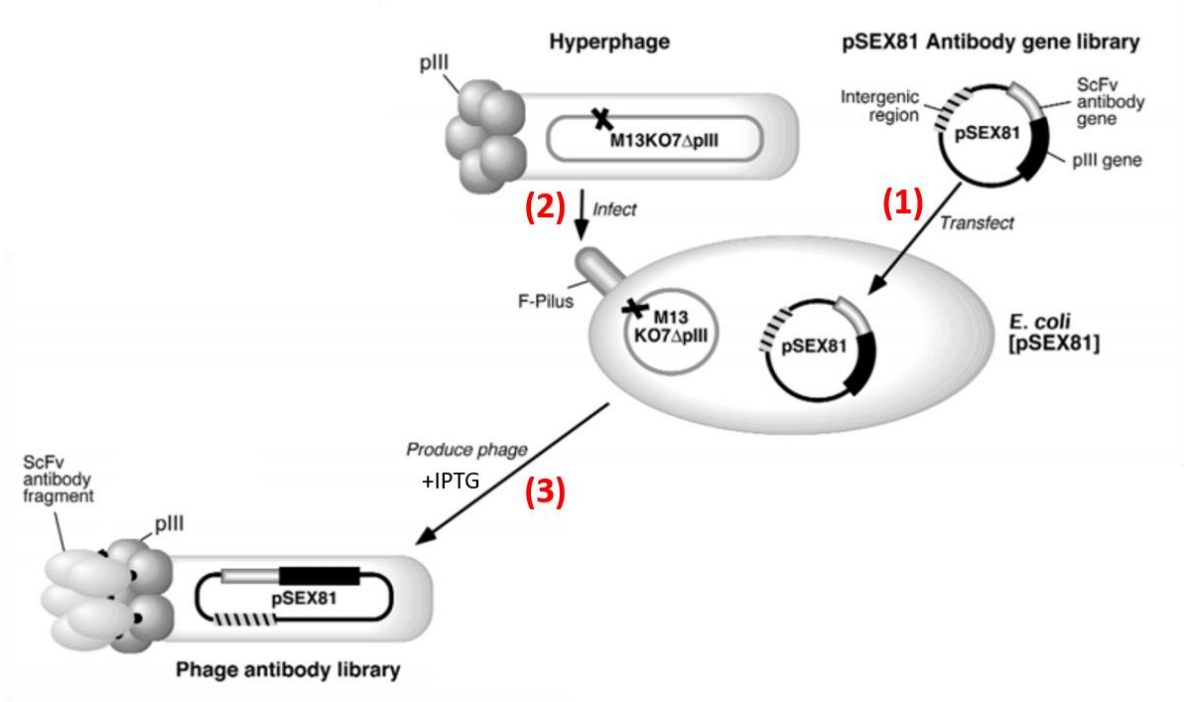


Figure 41 : Représentation schématique de la production de phage-scFvs. Extrait de Rondot et al. paru en 2000 dans Nature Biotechnologies. Le phagemide (ici pSEX81) est transfecté dans la bactérie E. coli qui est ensuite infectée par l'hyperphage. Lors de l'assemblage des phages-scFv, le phage va être constitué de plusieurs copies de la protéine de fusion P3-scFv (issues du gène du phagemide) associées aux protéines de charpente (issues des gènes contenus dans l'hyperphage).

II. A. 3) d) Etapes de sélection

La Figure 42 illustre les étapes d'un tour de sélection par phage-display. Après avoir produit les phage-scFvs (1) comme expliqué dans le paragraphe précédent, ceux-ci sont sélectionnés vis-à-vis de leur antigène d'intérêt. Cette étape de sélection peut se faire soit sur antigène immobilisé sur un support solide, soit sur des cellules (2). Dans les deux cas, les étapes sont les mêmes. Après de multiples lavages pour éliminer les phage-scFvs non fixés (3), les phage-scFvs sont élués (4), puis amplifié (5). Les phage-scFvs ainsi sélectionnés sont produits afin de faire un deuxième tour de sélection (6). La finalité des tours supplémentaires est de sélectionner les phage-scFvs spécifiques les plus affins.

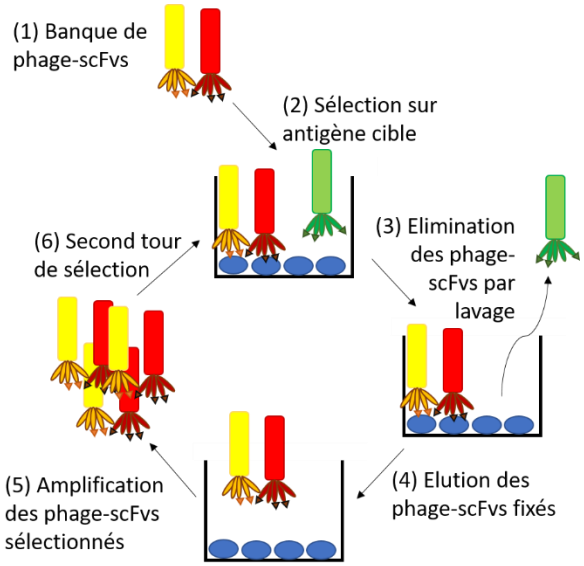


Figure 42 : Schéma des étapes de sélection du phage-display

II. A. 3) e) Criblage des phage-scFvs sélectionnés

Les phage-scFvs sélectionnés subissent ensuite une étape de criblage pour valider leur réactivité et isoler les plus spécifiques. Ce criblage peut être effectué par différentes méthodes biochimiques, telles que l'ELISA vis-à-vis de leur antigène d'intérêt. S'ensuit le séquençage des clones sélectionnés afin de vérifier l'intégrité des séquences des régions VH et VL, et de déterminer la séquence nucléique codante du fragment scFv. Cette étape permettra par la suite de procéder à un reformatage par ingénierie moléculaire et une production à grande échelle pour satisfaire les besoins d'études *in vitro* et *in vivo*.

II. A. 3) f) Reformatage et production à grande échelle

En fonction de la question biologique, il peut être nécessaire de modifier le format. Soit construire un anticorps entier, soit seulement rajouter un Fc si l'on veut allonger la durée de vie ou ajouter des fonctions effectrices. Une fois la séquence génique remaniée, les anticorps ou fragments d'anticorps sont produits à grande échelle dans les systèmes de production. Plusieurs systèmes de production existent actuellement, et celui le plus largement utilisé est le système mammalien avec les cellules

CHO (*Chinese Hamster Ovarian*). Cependant ce système de production, même s'il se rapproche le plus de la synthèse naturelle de protéines, est un procédé très onéreux. C'est pourquoi des méthodes de production alternatives ont été développées, avec pour chacune des avantages et inconvénients en fonction de certains critères (Tableau 7).

Tableau 7 : Avantages comparatifs des systèmes de production d'anticorps monoclonaux. Issu d'Olivier et Mehtali, Med Sci. 2009.

	Temps de génération du clone producteur	Capacité de production	Glycosylation	Activité ADCC	Sécurité biologique
Bactéries	++++	+	-	-	++++
Levures	++++	++	+	-	++++
Champignons filamenteux	++	++	+	-	++++
Cellules d'insectes	++	+	++	+	++++
Plantes transgéniques	+	++++	++	++	++++
Animaux transgéniques	+	++++	+++	++++	+++
Cellules aviaires	++	++	++++	++++	++++
Cellules de mammifères	++	+++	++++	++	+++

Par exemple, les si les glycosylations ne sont pas effectuées, cela peut se traduire par une diminution de la stabilité et de la solubilité et une augmentation de l'immunogénicité des anticorps. En effet, les glycosylations sont des modifications post-traductionnelles sur le Fc qui conditionnent les temps de demi-vie des anticorps ainsi que leur interaction avec les cellules effectrices (ADCC). Le système de production bactérien n'est donc pas un procédé adéquat pour la production d'anticorps entiers car les bactéries ne sont pas capables de réaliser ces glycosylations. Les systèmes de production en cellules d'insectes, dans les plantes ou animaux transgéniques nécessitent une humanisation des systèmes de glycosylation pour diminuer l'immunogénicité, et ne sont pas tous très productifs. Le système le plus efficace reste celui en cellules de mammifères, même si les progrès dans l'ingénierie des autres systèmes de production vont peut-être permettre le développement de systèmes de production moins onéreux (17).

II. A. 4) Application des anticorps au développement d'outils diagnostique et thérapeutiques

Les atouts des anticorps monoclonaux (leur spécificité, leur affinité, leur malléabilité) en ont fait une nouvelle classe thérapeutique dans la plupart des domaines médicaux. Les anticorps monoclonaux ont également été utilisés pour développer des outils de diagnostic pour l'imagerie, mais aussi pour de nombreux tests *in vitro* pour la recherche. Cinq anticorps thérapeutiques ont été approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2019 (13 en 2018) et 13 sont anticipés pour 2020 (18,19).

II. A. 4) a) Outils de diagnostic

Actuellement, deux anticorps entiers murins radiomarqués sont sur le marché : le besilesomab (SCINTIMUN®) couplé au Technetium-99m et indiqué dans le domaine de l'ostéologie (cible : CEACAM8 (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8))* a reçu son EMA (*European Medicines Agency*) en 2010, et le capromab (PROSTASCINT®) couplé à l'Indium-111 et indiqué dans le domaine de la cancérologie (cible : FOLH1 (*folate hydrolase prostate specific membrane antigen*)) a reçu son autorisation par la FDA en 1996. Une IgG1 humanisée, tocilizumab ((ro)ACTEMRA®), indiquée pour le diagnostic de l'arthrite rhumatoïde est également sur le marché (FDA en 2010), ciblant le récepteur de l'IL-6 (20). Aujourd'hui, de nombreuses techniques d'imagerie basées sur l'utilisation d'anticorps sont en cours de validation pré-clinique, notamment des anticorps couplés à des radionucléides pour l'imagerie TEP (tomographie par émission de positons) (21). Par exemple, un anticorps entier murin radiomarqué avec l'Iodine-125 est indiqué pour le diagnostic des cancers du sein, du colon et du rectum (20). Les anticorps monoclonaux sont également majoritairement utilisés dans les tests sérologiques, que ce soit pour détecter des anticorps contre des pathogènes dans le cas d'une infection, ou pour détecter des variations d'hormones dans le cas des tests de grossesse.

II. A. 4) b) Outils thérapeutiques

Les anticorps thérapeutiques sont une alternative thérapeutique efficace grâce à leur sélectivité naturelle et leur facilité de manipulation. Depuis la commercialisation du premier anticorps monoclonal thérapeutique en 1986, les nombreux progrès en biologie moléculaire ont permis d'améliorer l'efficacité des anticorps thérapeutiques. Ainsi, la technique du phage-display a permis de sélectionner de nombreux anticorps afin de traiter des maladies de domaines très différents, tels que les maladies auto-immunes (contre le TNFα dans la polyarthrite rhumatoïde), les maladies infectieuses (contre le virus de la dengue (22) et le nématode responsable de la filariose lymphatique (23)), les maladies cardiovasculaires (contre l'apolipoprotéine A1 (24) et contre les LDL oxydées (25)), et dans les maladies neurologiques (contre le transporteur du glutamate (VGLUT) (26)). Depuis 2018, il y a 93 anticorps thérapeutiques autorisés en France (80 dans le monde) ciblant quatre aires thérapeutiques

principales : l'oncologie, les dysfonctionnements du système immunitaire, les maladies infectieuses et le dysfonctionnement du système nerveux central (Figure 43).

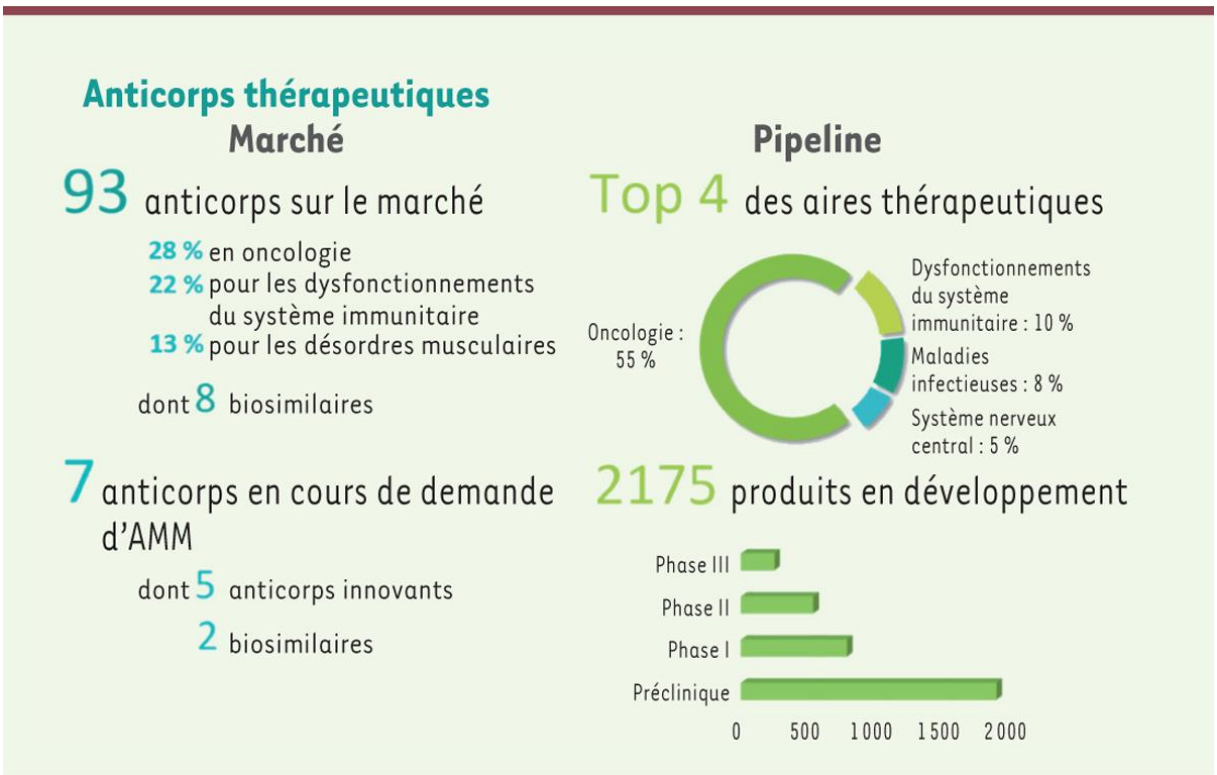


Figure 43 : Marché et pipeline des anticorps thérapeutiques en France. Issu de Mabdesign, janvier 2019.

La proportion d'anticorps monoclonaux mono-spécifiques, bi-spécifiques et conjugués est, respectivement, de 73,80%, 13,20% et 13% (27).

II. A. 4) b) (1) Mécanismes d'action des anticorps thérapeutiques

Anticorps neutralisants :

Les anticorps thérapeutiques neutralisants ont pour effet d'empêcher l'action d'une molécule, d'une protéine ou d'un pathogène. Ils peuvent être dirigés contre des antigènes exogènes (virus, toxines bactériennes, parasites, médicaments, venins) ou endogènes (cytokines, facteurs de croissance). Ils empêchent l'interaction entre ces antigènes et leur cible cellulaire par le seul effet de fixation et de neutralisation antigénique.

Anticorps antagonistes :

Les anticorps thérapeutiques peuvent aussi empêcher l'action d'une molécule en bloquant la liaison récepteur-ligand, c'est ce qu'on appelle des anticorps antagonistes. Ils vont se fixer sur les récepteurs bloquant ainsi la liaison du ligand. Ils peuvent cibler de nombreux récepteurs, tels que les récepteurs aux cytokines, aux facteurs de croissance ou aux molécules d'adhésion.

Anticorps agonistes :

Les anticorps thérapeutiques agonistes peuvent mimer l'action d'une molécule en se liant sur sa cible et en induisant la même réponse cellulaire. Comme les anticorps antagonistes, ils peuvent cibler de nombreux récepteurs, tels que les récepteurs aux cytokines, aux facteurs de croissance ou aux molécules d'adhésion.

Anticorps cytolytiques :

Certains anticorps thérapeutiques ont pour rôle d'induire un effet cytotoxique sur leur cellule cible grâce à leur fragment Fc. Ils peuvent activer la voie classique du complément par liaison au C1q, ou recruter les cellules cytotoxiques, telles que les cellules NK ou les macrophages. Ce sont les voies de lyse CDC, ADCP et ADCC.

II. A. 4) b) (2) Application en cancérologie

En cancérologie, les anticorps thérapeutiques sont utilisés de deux manières, soit en neutralisant les molécules de l'inflammation (telles que le TNF-α), soit en ciblant les cellules du système immunitaire. Cette dernière stratégie a pour rôle d'agir directement sur les cellules du patient pour qu'elles retrouvent leur capacité anti-tumorale. Cette stratégie n'est pas nouvelle, puisqu'en 1893 Willian B. Coley démontrait que l'injection de bactéries dans une tumeur induisait sa régression (car cela réactivait les cellules du système immunitaire). Les recherches du 20ème siècle ont ensuite expliqué le lien entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires. Les cellules immunitaires sont capables d'éliminer les cellules tumorales (car elles les reconnaissent comme du « non-soi ») jusqu'à un point critique où les cellules tumorales vont devenir capables d'échapper aux cellules immunitaires, c'est la théorie des « 3E : *elimination, equilibrium, and escape* » développée par Schreiber (28). Les cellules cancéreuses échappent au système immunitaire en activant les points de régulation des cellules immunitaires (*immune checkpoints*), induisant l'absence de réponse des cellules immunes vis-à-vis des cellules tumorales. La découverte d'anticorps bloquant ces points de régulation (*checkpoint inhibitors),* tels que des anticorps anti-CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4*) et anti-PD-L1 (*programmed cell death-ligand 1*), a permis une grande avancée dans l'immunothérapie anti-cancéreuse.

II. A. 4) b) (3) Application dans le traitement des maladies auto-immunes

L'adalimumab (Humira ®) est le premier anticorps totalement humain à avoir été accepté par l'EMA, la FDA et à avoir obtenu une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché). C'est un anti-TNFα prescrit dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde mais également dans d'autres maladies auto-immunes telles que la spondylarthrite ankylosante ou la maladie de Crohn. Il agit en se fixant sur le TNF-α de manière à le neutraliser et empêcher son action.

II. A. 4) b) (4) Application en infectiologie

Dans le domaine de l'infectiologie, l'apparition de résistances vis-à-vis des antibiotiques et de certains antiviraux a fortement influencé l'orientation de nouvelles stratégies thérapeutiques vers le développement des anticorps thérapeutiques. A l'heure actuelle cinq anticorps thérapeutiques sont acceptés en France : le palivizumab (SYNAGIS®), le raxibacumab (ABTHRAX®), l'obiltoximab (Anthim®), le bezlotoxumab (Zinplava®) et l'éculizimab (Soliris®). Les dernières avancées technologiques ont permis la découverte d'anticorps hyper neutralisants ainsi que la mise au point de cocktails d'anticorps monoclonaux permettant ainsi de mieux cibler les pathogènes, et de lutter contre la variabilité antigénique des différentes souches virales et bactériennes. Les études cliniques en cours concernent des anticorps thérapeutiques contre des bactéries (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) et des virus (influenza A, cytomégalovirus (CMV), virus Ebola, virus de la rage, virus Zika, Henipavirus, virus de la dengue (DENV) (29).

II. A. 4) b) (5) Application dans les maladies cardiovasculaires et métaboliques

Mis à part un des premiers fragments d'anticorps thérapeutiques de type Fab (l'abciximab) contre la thrombose coronaire, il y a extrêmement peu d'applications dans ce domaine. Depuis les années 2000, les recherches portent en parallèle sur les atteintes métaboliques et sur l'inflammation, connues comme étant des facteurs de risque de l'athérosclérose. Deux anticorps ciblant la PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) ont été acceptés : l'évolocumab (Repatha®) et l'alirocumab (Praluent®) pour le traitement de l'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires (30). PCSK9 joue un rôle essentiel dans le métabolisme des LDL en inhibant la réexpression des récepteurs aux LDL à la surface cellulaire. Les anticorps ciblant cette protéine ont permis une réduction de plus de 60% du cholestérol circulant (31). Deux anticorps sont en phase I et II de développement pour le traitement de l'athérosclérose : le foralumab et l'orticumab ciblant, respectivement, le CD3ε et les LDLox (20). Concernant l'inflammation, le canakinumab ciblant l'IL-1β a été étudié dans des études cliniques et a permis une diminution des événements cardiovasculaires, mais provoquant des effets secondaires indésirables telles que des infections fatales (32). Il apparaît donc nécessaire de découvrir de nouvelles cibles plus spécifiques des plaques à risque de rupture. C'est dans cette optique que s'inscrivent nos recherches.

Depuis leur découverte, les connaissances sur les anticorps ont connu un essor considérable, au point que ceux-ci sont maintenant de véritables atouts diagnostiques et thérapeutiques. Ils sont considérés comme une alternative pertinente aux antibiotiques dont les résistances augmentent de plus en plus. Ils ont également permis de proposer un traitement pour certaines maladies rares qui n'en avaient, jusqu'à présent, aucun. Ils ont permis aussi le développement de nombreux tests de diagnostic rapide (TDR) améliorant ainsi la prise en charge thérapeutique des patients. De plus, ils sont présents dans la plupart des domaines pathologiques. Les anticorps sont donc d'une grande efficacité thérapeutique. Par ailleurs, il est maintenant possible d'obtenir des anticorps ciblant une cible choisie, beaucoup plus facilement et rapidement, grâce à la technique du phage-display. C'est pourquoi dans le cadre de notre projet de recherche, nous avons mis au point une sélection par phage-display afin de sélectionner des anticorps humains ciblant les macrophages de la plaque d'athérome. Ces anticorps pourront alors être utilisés pour mettre au point des outils de diagnostic ou de thérapie.

Références :

1. Behring E von, Kitasato S. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. Dtsch Med Wochenschrift. 1890;49:1113–1114.

2. Kaufmann SHE. Remembering Emil von Behring: from Tetanus Treatment to Antibody Cooperation with Phagocytes. mBio. 2017 Feb;8(1).

3. Behring E von. Untersuchungen über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität bei Thieren. Dtsch Med Wochenschrift. 1890;50:1145–1148.

4. Kaufmann SHE. Immunology's Coming of Age. Front Immunol. 2019 Apr 3;10.

5. Clardy J, Fischbach MA, Currie CR. The natural history of antibiotics. Curr Biol. 2009 Jun 9;19(11):R437–41.

6. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495–7.

7. Wei W, Rosenkrans ZT, Liu J, Huang G, Luo Q-Y, Cai W. ImmunoPET: Concept, Design, and Applications. Chem Rev. 2020 Apr 22;120(8):3787–851.

8. Krishnamurthy A, Jimeno A. Bispecific antibodies for cancer therapy: A review. Pharmacol Ther. 2018;185:122–34.

9. Topp MS, Gökbuget N, Stein AS, Zugmaier G, O'Brien S, Bargou RC, et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. Lancet Oncol. 2015 Jan;16(1):57–66.

10. Bathula NV, Bommadevara H, Hayes JM. Nanobodies: The Future of Antibody-Based Immune Therapeutics. Cancer Biother Radiopharm. 2020 Sep 16;

11. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol. 2005 Sep;23(9):1126–36.

12. Fajardo-Ramírez ÓR, Ascacio-Martínez JAI, Licea-Navarro AF, Villela-Martínez LM, Barrera-Saldaña HA. Technological Evolution in the Development of Therapeutic Antibodies. Rev Investig Clin Organo Hosp Enfermedades Nutr. 2015 Jun;67(3):158–69.

13. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature. 1990 Dec;348(6301):552–4.

14. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. Annu Rev Immunol. 1994;12:433–55.

15. Barbas CF. Recent advances in phage display. Curr Opin Biotechnol. 1993 Oct 1;4(5):526–30.

16. Philibert P, Stoessel A, Wang W, Sibler A-P, Bec N, Larroque C, et al. A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. BMC Biotechnol. 2007 Nov 22;7:81.

17. Olivier S, Mehtali M. Les systèmes alternatifs de production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques - Avantages espérés pour le futur. médecine/sciences. 2009 Dec 1;25(12):1163–8.

18. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019. mAbs. 2019 Mar;11(2):219–38.

19. Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM. Antibodies to watch in 2020. mAbs. 2020 Dec;12(1):1703531.

20. IMGT/mAb-DB [Internet]. [cited 2020 Oct 22]. Available from: http://www.imgt.org/mAb-DB/search.action;jsessionid=2C2BEA5C967E1223D090A3EEE2A8F6A2

21. Larivière M, Bonnet S, Lorenzato C, Laroche-Traineau J, Ottonès F, Jacobin-Valat M-J, et al. Recent Advances in the Molecular Imaging of Atherosclerosis. Semin Thromb Hemost. 2020 Jul;46(5):563–86.

22. Lebani K, Jones ML, Watterson D, Ranzoni A, Traves RJ, Young PR, et al. Isolement of serotype-specific antibodies against dengue virus non-structural protein 1 using phage display and application in a multiplexed serotyping assay. PLoS ONE. 2017 Jul 6;12(7).

23. Omar N, Hamidon NH, Yunus MH, Noordin R, Choong YS, Lim TS. Generation and selection of naïve Fab library for parasitic antigen: Anti-BmSXP antibodies for lymphatic filariasis. Biotechnol Appl Biochem. 2018 May;65(3):346–54.

24. Huang Y, DiDonato JA, Levison BS, Schmitt D, Li L, Wu Y, et al. An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. Nat Med. 2014 Feb;20(2):193–203.

25. Kumano-Kuramochi M, Fujimura T, Komba S, Maeda-Yamamoto M, Machida S. Screening, expression, and characterization of an anti-human oxidized low-density lipoprotein single-chain variable fragment. J Biosci Bioeng. 2016 Sep 1;122(3):287–93.

26. Schenck S, Kunz L, Sahlender D, Pardon E, Geertsma ER, Savtchouk I, et al. Generation and Characterization of Anti-VGLUT Nanobodies Acting as Inhibitors of Transport. Biochemistry. 2017 01;56(30):3962–71.

27. MabDesign-Immunowatch-Edition1-February2020.pdf [Internet]. [cited 2020 Oct 7]. Available from: https://www.mabdesign.fr/wp-content/uploads/2020/02/MabDesign-Immunowatch-Edition1-February2020.pdf

28. Fridman WH. Historique de l'immunothérapie. Changement de paradigme ? Bull Cancer (Paris). 2016 Nov 1;103:S122–6.

29. Desoubeaux G, Pelegrin M. Anticorps monoclonaux en infectiologie: Des nouveaux partenaires dans l'arsenal thérapeutique. médecine/sciences. 2019 Dec;35(12):1008–13.

30. Catapano AL, Pirillo A, Norata GD. New Pharmacological Approaches to Target PCSK9. Curr Atheroscler Rep. 2020 Jun 3;22(7):24.

31. Toth S, Pella D, Fedacko J. Vaccines Targeting PSCK9 for the Treatment of Hyperlipidemia. Cardiol Ther. 2020 Jul 31;

32. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. N Engl J Med. 2017 21;377(12):1119–31.

Matériel & Méthodes

I. Culture cellulaire

I. A. Isolement des PBMCs

Les cellules périphériques du sang (PBMCs) ont été isolées à partir du sang de patients provenant de l'EFS (Etablissement Français du Sang) de Bordeaux. Le sang, datant de 24h maximum, est dilué au demi dans du PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 1X stérile avant d'être déposé sur du Ficoll-Paque Premium 1.073 density gradient (GE Healthcare, Sweden) dans des tubes dédiés (SepMate™-50, StemCell, Palo Alto, Etats-Unis), avec pour proportion 12mL de Ficoll pour 30 à 35mL de sang dilué. Les tubes sont ensuite centrifugés à 400g pendant 30min avec un frein faible. Les anneaux de PBMCs sont délicatement récupérés sans prélever de globules rouges, poolés, dilués au demi dans du milieu RPMI-1640 (PAN BioTech, Dutscher, France) et centrifugés à 280g pendant 15min. Les culots de PBMCs sont ensuite lavés deux fois dans du RPMI et centrifugés à 70g pour éliminer les plaquettes.

Les PBMCs ainsi obtenues ont toujours été congelées avant d'être utilisées (pour éliminer les globules rouges lors de la congélation). Elles sont congelées à 20millions/mL dans du milieu RPMI à 50% de sérum de veau fœtal (SVF) et 50% de RPMI-25%DMSO-20%SVF, et conservées à -80°C pendant 4 à 5 mois.

I. B. Isolement des monocytes

L'isolement des monocytes à partir des PBMCs a été réalisé en effectuant une sélection négative où les cellules non-monocytaires du sang, telles que les cellules T, les cellules NK, les cellules B, les cellules dendritiques et les basophiles sont indirectement marquées magnétiquement à l'aide d'un cocktail d'anticorps conjugués à la biotine et de micro-billes anti-biotine. Cet isolement a été réalisé grâce à un kit d'isolement des monocytes de type PAN (Pan Monocyte Isolement Kit, human ref 130-096-537, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) d'après les recommandations du fournisseur. Le tube de PBMCs est décongelé 2min à 37°C, les PBMCs sont ensuite transférées dans du RPMI-50%SVF puis centrifugées 7min à 210g. Le culot cellulaire est repris dans du RPMI-20%SVF, laissé 15-30min à température ambiante le temps que les cellules éliminent le DMSO de la congélation avant une nouvelle centrifugation de 7min à 210g. Les recommandations de Miltenyi pour le PAN consistent à additionner, pour 2.10^8 cellules, 800µL de tampon A (PBS-0,5% p/v BSA et EDTA 2mM), 200µL de bloqueur du récepteur Fc, 200µL de cocktail d'anticorps conjugués à la biotine, homogénéiser et incuber 12min à 4°C. Ensuite, 600µL de tampon A sont à nouveau ajoutés suivi de 400µL de micro-billes anti-biotine avant d'homogénéiser et d'incuber 12min à 4°C. Les cellules marquées sont ensuite déposées sur une colonne magnétique (LS column, Miltenyi BioTec), préalablement équilibrée avec

3mL de tampon A, à hauteur de 1.10^8 cellules/colonne max puis 6mL de tampon A sont déposés pour rincer la colonne.

I. C. Culture des macrophages

I. C. 1) Différenciation des monocytes en macrophages

Les monocytes purifiés sont cultivés pendant cinq à six jours dans du milieu complet (milieu RPMI-1640 (PAN BioTech, Dutcher, France) contenant 10% (v/v) de sérum AB humain (Dutscher) inactivé par la chaleur (56°C, 30min), de la pénicilline (100 U/mL), de la streptomycine (100 µg/mL) et du M-CSF recombinant humain (Miltenyi Biotec) à la concentration finale de 20 ng/mL pour permettre la différenciation des monocytes purifiés en macrophages dérivés de monocytes (MDM). Au bout de 2-3 jours, la moitié du milieu est remplacée par un milieu de différenciation frais contenant 40 ng/mL de M-CSF (pour conserver une concentration finale de 20 ng/mL). Après cette période de différenciation, 24 heures avant la stimulation des macrophages, le milieu est remplacé par du milieu complet chaud sans M-CSF (et sans rouge phénol pour les cellules destinées à l'imagerie de fluorescence). Pour l'analyse des propriétés optiques, les cellules sont cultivées à une concentration de 2,5 à 5.10^5 cellules/ml sur lamelles de verre dans des plaques de culture cellulaire Primaria™ 24-puits (Fisher Scientific, Illkirch, France). Pour les études de cytométrie en flux, de criblage de clones et de Seahorse, les cellules sont cultivées dans des plaques de culture cellulaire Primaria™ 6-puits (Fisher Scientific), des plaques de culture cellulaire Primaria™ 96-puits (Fisher Scientific) ou des plaques de culture de cellules XF-96 (Seahorse Bioscience, North Billerica, Etats-Unis), respectivement, et à des concentrations de 5 à 6.10^5 cellules/ml.

I. C. 2) Stimulation des macrophages : obtention des différents modèles

Les macrophages des différents donneurs ont été stimulés pendant 48h (cytométrie en flux et microscopie) ou 24h (Seahorse) dans des expériences indépendantes. La polarisation M1 a été obtenue en stimulant les MDM avec 20 ng/ml (400 U/mL) de rh IFN-γ (Miltenyi Biotec) et 100 pg/mL de LPS (adapté à la culture cellulaire, irradié en y, BioXtra LPS, BioXtra LPS, Sigma Aldrich). Pour la polarisation M2, les MDM ont été stimulés avec 20 ng/ml de rh IL-4 (100 U/mL) et de rh IL-13 (8 U/mL) (Miltenyi Biotec). Les macrophages non stimulés sont appelés «M0» et utilisés comme contrôles. Les différents modèles de macrophages spumeux ont été générés en stimulant les MDM pendant 24-48 heures avec des lipoprotéines de basse densité oxydées ou acétylées humaines (LDLox ou LDLac) à la concentration de 50 µg/mL (Clinisciences, Nanterre, France) avec ou sans extrait carotidien (EC) préparé à partir d'un pool de biopsies (plaques d'athérome de la carotide) de 25 patients différents. Un modèle de macrophages spumeux avec seulement des extraits carotidiens a également été développé. Ces extraits ont été placés dans un insert (Dutscher) qui permet uniquement l'échange de facteurs

solubles. Après un ou deux jours de stimulation, les cellules des différentes conditions, M_0, M_1, M_2, M_{oxLDL}, $M_{oxLDL+EC}$, M_{LDLac}, $M_{LDLac+EC}$ et M_{EC} ont été directement analysées pour leurs propriétés optiques et métaboliques, ou récoltées pour être analysées par cytométrie en flux après immuno-marquage.

II. Caractérisation phénotypique des macrophages

II. A. Etude de la morphologie et du contenu en lipides

Les macrophages ont été cultivés sur des lamelles de verre, et stimulés comme expliqué précédemment (cf § I. C. 2)). Les cellules ont ensuite été fixées avec du PFA (Paraformaldehyde) 4% avant d'être lavées en isopropanol 60% 15 secondes. Les lamelles avec les cellules ont ensuite été plongées dans un bain de solution de coloration d'Oil Red O (Sigma Aldrich) dilué au 3/5ème dans de l'eau stérile pendant 30 à 60 secondes, avant d'être à nouveau lavées en isopropanol 60% 15 secondes puis trois fois une minute en PBS 1X. Enfin, les lamelles ont été montées sur des lames avec une goutte de milieu de montage Coverquick® et observées au microscope (DM5500 B LEICA, Leica Microsystems, Mannheim, Allemagne) aux grossissements 20X et 63X à immersion.

II. B. Etude des marqueurs de surface par cytométrie en flux

L'immunophénotypage des macrophages a été effectué par cytométrie en flux grâce à des anticorps ciblant des marqueurs spécifiques de chaque type de macrophage. La cytométrie en flux est une technique d'analyse cellulaire dans laquelle un flux liquide permet de faire passer les cellules une à une devant un laser. Ce dernier peut mesurer plusieurs propriétés cellulaires, telles que la taille (*Forward Scatter*), la granulométrie (*Side Scatter*), mais également la fluorescence. Cela peut être de l'autofluorescence, mais également de la fluorescence due à l'utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes et ciblant des molécules sur les cellules. Les signaux lumineux provenant de ces différentes propriétés sont séparés par un jeu de filtres optiques puis détectés par des photomultiplicateurs qui vont les amplifier afin qu'ils soient numérisés et traités par des systèmes électronique et informatique (Figure 44). L'appareil que nous avons utilisé (*MACS quant, Miltenyi Biotec*) possède trois lasers (405nm, 488nm et 640nm) permettant de travailler avec plusieurs fluorochromes en même temps.

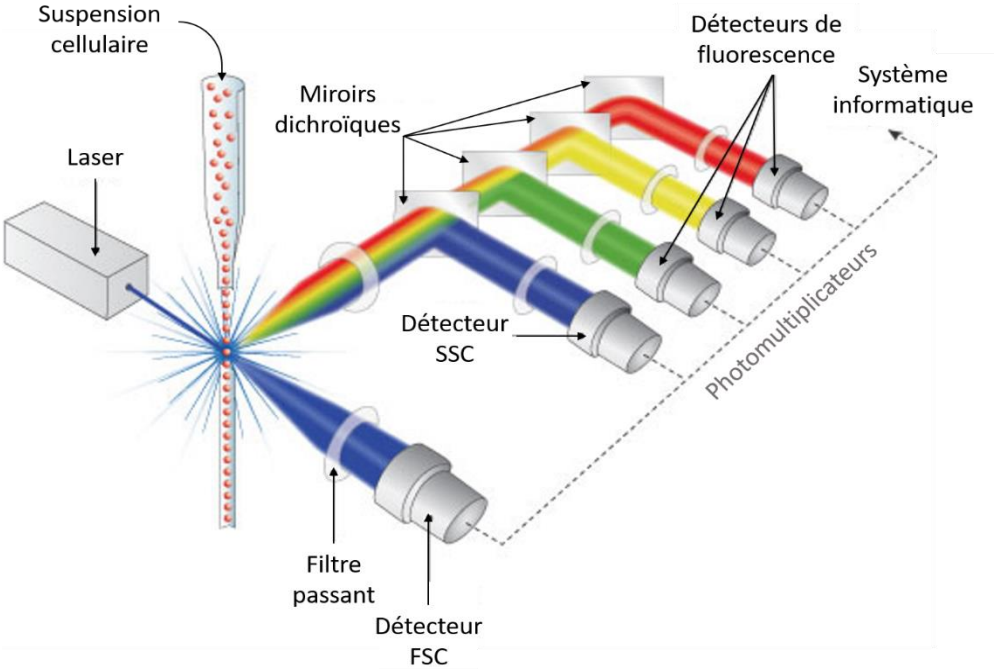


Figure 44 : Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux. (Extrait de https://www.semrock.com/flow-cytometry.aspx)

Un panel d'anticorps comprenant six anticorps différents a été utilisé (*Miltenyi Biotec*) (Tableau 8).

Tableau 8 : Panel des anticorps spécifiques des macrophages pro- et anti-inflammatoires. Anticorps provenant de Miltenyi Biotec

Anticorps	Spécificité	Fluorochrome
CD40	M1	PE-Vio770
CD86	M1	FITC
CD197	M1	PerCP-Vio700
CD163	M2	PE
CD206	M2	APC-Vio770
CD200R	M2	APC

Après activation des macrophages pendant 48h, les cellules sont lavées en PBS 1X chaud puis récoltées par grattage doux sur la glace à l'aide de Versène (Dutscher) avant d'être centrifugées à 200g pendant 7min. Les culots de cellules sont repris dans du PBS 1X stérile et répartis dans les tubes, de manière à avoir au moins 1.10^4 cellules/tube. Un marquage préalable avec le marqueur Viobility™ (405/520) (Miltenyi Biotec) a été effectué pour la détection et la discrimination des cellules mortes. Ensuite, un Tandem Signal Enhancer (*Miltenyi Biotec*) a été utilisé pour bloquer la liaison des anticorps aux FcR et

la liaison non spécifique aux macrophages. Enfin, trois conditions cellulaires ont été réalisées. La première est le multi-marquage avec le cocktail d'anticorps spécifiques. La deuxième est le multi-marquage avec le cocktail d'anticorps contrôle isotype de concentrations équivalentes utilisés comme contrôle. La troisième contient seulement les cellules non marquées. Lors du premier test, en plus de ces trois conditions de marquage, nous avons également rajouté des conditions avec les cellules marquées avec un seul des anticorps (conditions simples marquées) comme contrôle de la fluorescence de chaque anticorps seul. Les cellules sont fixées avec du PFA 4% puis acquises à l'aide d'un analyseur MACS QUANT 10. Lors de la première acquisition, les seuils de détection des fluorescences sont vérifiés et, éventuellement, corrigés grâce aux contrôles des cellules simples marquées. Lors des acquisitions suivantes, les contrôles simples marquées ne sont plus nécessaires car les données des seuils de détection ont été enregistrées et peuvent ainsi être réutilisées d'une fois sur l'autre. L'analyse des résultats a été réalisée par le logiciel FlowLogic (Miltenyi). Après l'acquisition, il faut vérifier que les fluorescences ne se superposent pas entre canaux adjacents, si c'est le cas, il faut corriger en créant une matrice de compensation qui est ensuite sauvegardée pour être réutilisée pour les expériences ultérieures. Les cellules sont ensuite sélectionnées successivement, d'abord les macrophages (pour éliminer les débris), puis les cellules seules (pour éliminer celles qui sont passées à deux devant le laser faussant ainsi la mesure), puis les cellules vivantes et enfin les cellules positives pour chaque marqueur. Au sein de ces cellules positives, le pourcentage de cellules positives et l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) pour chaque marqueur différent au sein d'une population spécifique de MP ont été utilisés pour définir les différentes populations de macrophages. Plus précisément, lorsque nous parlons de MFI, nous n'avons pas utilisé la moyenne arithmétique (*mean*) mais la moyenne géométrique (*geomean*). Nous avons choisi la moyenne géométrique car elle permet de diminuer l'importance des points très fluorescents non représentatifs de la population et ainsi donner davantage de poids aux points faisant partie du nuage de points principal. Cela nous a permis d'homogénéiser les résultats que nous voyons sur les nuages de points et les résultats statistiques sur les graphiques en bâtons. Cependant, pour plus de lisibilité nous avons choisi d'écrire MFI plutôt que geoMFI.

Le test statistique effectué est un ANOVA avec données regroupées suivi d'un test *post-hoc* de Tukey.

III. Caractérisation fonctionnelle des macrophages : dosage des cytokines

Afin de déterminer la fonction de nos macrophages, nous avons dosé les cytokines produites. Nous avons dosé deux cytokines inflammatoires (IL-6 et TNF-α) et une anti-inflammatoire (IL-10) grâce aux kits de dosage Peprotech, Rocky Hill, Etats-Unis (900-K16 Human IL-6 ABTS EDK Kit, 900-K25 Human TNF-alpha ABTS EDK Kit et 900-K21 Human IL-10 ABTS EDK Kit). Le dosage des cytokines produites par les cellules a été effectué dans le surnageant cellulaire de quatre donneurs, qui avait été préalablement congelé à -80°C après 24h de stimulation. Le protocole est le même pour chaque cytokine.

Dans un premier temps, les plaques sont recouvertes avec l'anticorps de capture (anti-IL-6, anti-IL-10 ou anti- TNF-α) à 1µg/mL toute la nuit à température ambiante. Le lendemain, les puits sont vidés et rincés 4 fois avec du tampon de lavage (PBS-0,05% de Tween20) puis saturés avec 300µL de PBS-1%BSA pendant 1h à température ambiante avant d'être à nouveau lavés 4 fois dans le tampon de lavage. 100µL d'échantillon (purs) et la gamme (de 0 à 2500pg/mL) sont déposés et incubés. Après 2h d'incubation à température ambiante, les puits sont à nouveau lavés 4 fois avant l'ajout de 100µL de l'anticorps de détection biotinylé à 0,5µg/mL pendant 2h à température ambiante. De même, les puits sont à nouveau lavés 4 fois avant le dépôt de 100µL d'avidine couplée à l'HRP (*HorseRadish Peroxidase*) (au 1/2000e) pendant 30min à température ambiante. Après 4 lavages, 100µL de substrat de révélation de type o-Phenylenediamine dihydrochloride (SIGMAFAST™ OPD, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-unis) sont ajoutés par puits avant lecture au spectrophotomètre à 450nm, 20min plus tard.

En parallèle, les cytokines présentes dans le pool d'extraits de plaques d'athérome carotidiennes utilisé pour stimuler les macrophages ont également été dosées. Nous avons également utilisé les kits de dosage Peprotech, pour les cytokines pro-inflammatoires IL-6, TNFα et IFNγ (Human IFN-gamma ABTS EDK Kit), et anti-inflammatoire IL-4 (Human IL-4 ABTS EDK Kit), IL-13 (Human IL-13 ABTS EDK Kit) et IL-10. Le protocole est le même que celui décrit ci-dessus.

IV. Caractérisation métabolique des macrophages

IV. A. Détection d'intermédiaires du métabolisme (NADH et FAD) par imagerie bi-photonique

Des images ont été acquises par TPEF (*Two-Photon Excited Fluorecscence*) à la plateforme de microscopie du Bordeaux (BIC) avec un Leica TCS SP5 sur un support vertical DM6000 (Leica Microsystems, Mannheim, Allemagne). Un laser Ti: Sa MaiTai accordable (Spectra-Physics, Irvine, USA) avec des impulsions de 100fsec et un taux de répétition de 80MHz, a été utilisé comme source d'excitation à deux photons, réglé à 760nm pour le NADH et à 860nm pour le FAD. La lumière laser a été focalisée à travers un objectif d'immersion dans l'eau 25X, 0,95 NA (Leica HCX IRAPO L). L'autofluorescence a été détectée avec un détecteur hybride interne en mode standard réglé à 100% (dynamique 12 bits) après avoir traversé un filtre passe-bande accordable, réglé de 420nm à 500nm pour l'émission NADH et de 520nm à 540nm pour l'émission FAD. Les images ont été acquises avec une résolution latérale de 0,6 µm et un pas axial de 4 µm, ce qui, après traitement, donnait des images 3D de 620x620x40µm^3. L'analyse des images a été réalisée par notre collaborateur Julien Brévier, Maître de conférences à Limoges. Une macro personnalisée sur Fidji a été utilisée pour traiter les images 3D, permettant de mesurer la densité volumique de l'autofluorescence du NADH et du FAD, et de calculer le ratio redox optique (ORR) correspondant pour chaque cellule. La normalisation de la mesure d'autofluorescence tenant compte de la variabilité de l'excitation à 2 photons a été effectuée par rapport aux niveaux moyens d'autofluorescence des cellules polarisées M1. Des données ont été recueillies sur 300 à 1000 cellules pour chaque condition de stimulation et chaque donneur. Les valeurs moyennes d'autofluorescence et de l'ORR ont ensuite été déterminées pour chaque population spécifique de macrophages.

IV. B. Respiration cellulaire par analyse des flux cellulaires

Les MDM sont ensemencés en quadriplicats (100 à 120 000 cellules/puits) dans des plaques de culture de cellules XF-96 (Seahorse Bioscience) et stimulés pendant 24h (cf § I. C. 2)). Le milieu des cellules est retiré (mis à congeler pour doser les cytokines ultérieurement) et remplacé par du milieu enrichi. Deux types de milieux ont été utilisés ; le milieu recommandé par le fournisseur Seahorse (milieu de base Seahorse + 5mM de pyruvate + 0,2mM de glutamine + 1,6mM de glucose) et le milieu équivalent au milieu utilisé pour les expériences de microscopie (milieu de base Seahorse + 2mM de glutamine + 11mM de glucose + 2% de sérum humain AB (il n'était pas possible de mettre 10% car cela obstrue les

circuits du Seahorse)). Les cellules sont ensuite incubées 30-60min maximum dans l'étuve 37°C sans CO_2. Les solutions des inhibiteurs de la chaîne respiratoire sont préparées pour avoir une concentration finale dans le puits de 0,75µM d'oligomycine, 1,5µM de CCCP (carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazone) et 0,8µM de roténone+antimycine. L'oligomycine est un inhibiteur de l'ATP synthase empêchant la synthèse d'ATP. Le CCCP est un découplant de la membrane mitochondriale, autrement dit, il déstabilise le gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Pour rétablir ce gradient la chaîne respiratoire va fonctionner à son maximum, permettant de déterminer la capacité respiratoire maximale. La roténone et l'antimycine inhibent, respectivement, le complexe I et le complexe III bloquant ainsi complètement la chaîne respiratoire. Chaque solution d'inhibiteurs est déposée dans la plaque d'injection qui est insérée dans l'appareil (XF-96 Analyser, Seahorse Bioscience) pour le calibrer. Une fois la calibration terminée, notre plaque de cellules est déposée dans l'appareil et les mesures de suivi de la respiration et du pH sont lancées. Ces mesures sont effectuées grâce à des sondes mécaniques couplées à des fluorochromes sensibles aux variations d'oxygène (pour la mesure de la respiration cellulaire) et au pH (pour la mesure de l'état glycolytique des cellules). Lorsque ces sondes se posent juste au-dessus des cellules, elles isolent un petit volume de milieu au-dessus des cellules permettant ainsi de détecter toute variation due à un changement métabolique. Trois mesures sont effectuées par puits avant la première injection d'inhibiteurs et après chaque injection. Le Seahorse XFe96 Analyser est un appareil de mesure du taux de consommation de l'oxygène, appelé OCR (*Oxygen Rate Consumption*), et du taux d'acidification extracellulaire, nommé ECAR (*ExtraCellular Acidification Rate),* dans les cellules vivantes. Il permet ainsi de mesurer en temps réel les fonctions cellulaires que sont la respiration mitochondriale et la glycolyse (Figure 45).

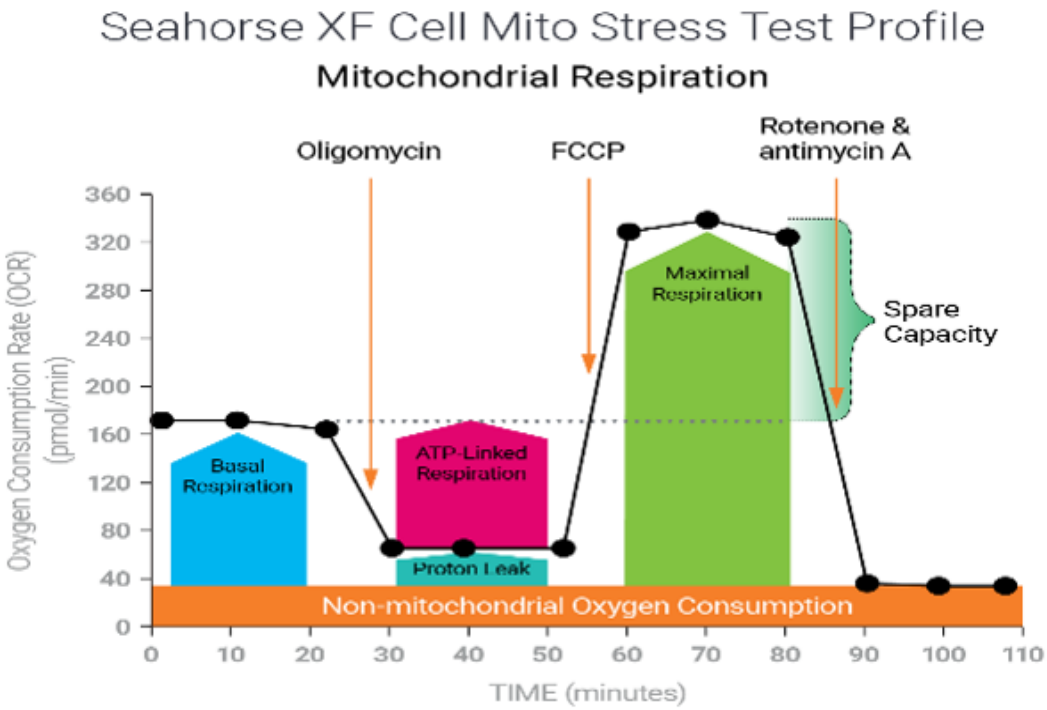


Figure 45 : Courbe représentative de la mesure de la consommation d'oxygène par Seahorse. Les trois premiers points correspondent à la respiration de base. L'injection d'oligomycine inhibe l'ATP synthase chargée de la synthèse d'ATP. La différence entre les premiers points et ceux obtenus après l'injection d'oligomycine indique donc la fraction de la respiration liée à la synthèse d'ATP mitochondrial. La seconde injection (FCCP ou son équivalent le CCCP) découple la membrane interne mitochondriale ce qui va diminuer le gradient de protons faisant fonctionner la chaîne repiratoire. La chaîne respiratoire va donc fonctionner à son maximum afin de remettre en place le gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne. Cela permet d'avoir une idée de la respiration maximale possible dans la cellule, et par soustraction, de la capacité de réserve (spare capacity) respiratoire mitochondriale (différence entre les points suivants l'injection de FCCP et les points correspondant sà la respiration basale). Enfin, l'injection du cocktail roténone/antimycine inhibe, respectivement, les complexes I et III, empêchant ainsi complètement la chaîne respiratoire de fonctionner. Le différence entre les points suivant l'injection de roténone/antimycine et ceux suivant l'injection d'oligomycine permet de déterminer la fuite de proton, c'est-à-dire les protons utilisés pour respirer mais qui ne rentrent pas dans la synthèse d'ATP.

À la fin des expériences sur le Seahorse, la quantité de protéines cellulaires a été dosée par un kit (Bio-rad Protein Assay, Bio-Rad®, Hercules, Etats-Unis) pour normaliser les données ECAR et OCR. Puis, un test statistique a été effectué par le logiciel Prism8 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) : ANOVA avec données regroupées suivi d'un test *post-hoc* de Tukey (n=6 donneurs).

IV. C. Dosage de l'ATP

Les MDM ont été ensemencés (20 000 cellules/puits) dans des plaques de culture de cellules 96-puits adaptées pour l'étude de la luminescence et traitées pour la culture cellulaire (Thermo Scientific, référence 165306). Les cellules ont été stimulées 24h (cf § I. C. 2)). Un cocktail d'inhibiteurs des complexes de la chaîne respiratoire (Antimycine à 100µM, Roténone à 0,5µM et Oligomycine à 3µM) a été préparé afin de distinguer l'ATP produit par la chaîne mitochondriale (via l'ATP synthase) de l'ATP

issu de la glycolyse. La moitié des cellules de chaque condition a été incubée 1h à 37°C avec ce cocktail, l'autre moitié sans les inhibiteurs. La gamme d'ATP est déposée, suivie de l'ajout du substrat contenant la Luciférase 10min avant lecture au Luminoskan (Labsystems Luminoskan EL391A). La quantité d'ATP produit est déterminée grâce à la gamme. L'origine de l'ATP produit est, elle, déterminée grâce au cocktail d'inhibiteurs. L'ATP non mitochondrial (glycolyse) correspond à la quantité d'ATP mesurée dans les puits avec les inhibiteurs tandis que l'ATP mitochondrial (ATP synthase) est calculée en soustrayant la valeur obtenue avec les inhibiteurs de la valeur obtenue sans les inhibiteurs.

V. Phage-display sur le modèle de macrophages spumeux

V. A. Banque utilisée

La banque de fragments d'anticorps de type scFv a été réalisée par Mondon, *et al* en 2006 (brevet N° WO0242311, WO2007137616) (1). Elle a été obtenue en amplifiant les ARN messagers des gènes codant pour les domaines variables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines humaines issues de personnes saines et de patients atteints de diverses pathologies telles que le cancer, les maladies inflammatoires et les maladies auto-immunes. L'amplification des gènes VH et VL s'effectue indépendamment afin d'obtenir deux répertoires : le répertoire des gènes VH et le répertoire des gènes VL. Les gènes VH et VL sont ensuite associés aléatoirement par PCR en ajoutant un linker (courte séquence peptidique) s'hybridant en 3' du gène VH et en 5' du gène VL. Cette courte séquence sert de bras flexible entre le gène VH et le gène VL. Les séquences géniques contenant le VH, le linker et le VL sont ensuite insérées dans des plasmides, ce qui constitue le répertoire de la banque. La banque est obtenue après transfection de ces plasmides dans les bactéries XL1-blue *E. coli*, avec une diversité de l'ordre de $3{,}4.10^9$ associations de VH-VL (scFv) différents. Pour mimer le processus d'hypermutations somatiques, des modifications ont été apportées aléatoirement par des polymérases de faible fidélité dites « mutases » lors des PCR associant les gènes VH et VL.

Dans l'objectif de sélectionner des anticorps ciblant spécifiquement la plaque d'athérome, une première sélection par phage-display a été réalisée dans un modèle de lapin athéromateux avant mon arrivée dans le laboratoire. La banque a été injectée dans le lapin, puis après sacrifice de l'animal, l'aorte a été extraite et les phage-scFvs fixés ont été élués. Deux autres tours de sélection ont été réalisés (dans deux autres lapins). Plusieurs fractions ont été obtenues après élution des phage-scFvs des différentes couches cellulaires des plaques d'athérome : la couche endothéliale (F1), la couche intraplaque extracellulaire (F2) et la couche intraplaque intracellulaire (F3). Ces fractions sont conservées sous forme de bactéries XL1-blue *E. coli* contenant les phagemides des phage-scFvs

sélectionnés (Figure 46). A la fin d'un tour de sélection, les fractions sont amplifiées et dénombrées de manière à injecter dans un nouveau lapin 10^{11} phage-scFvs.

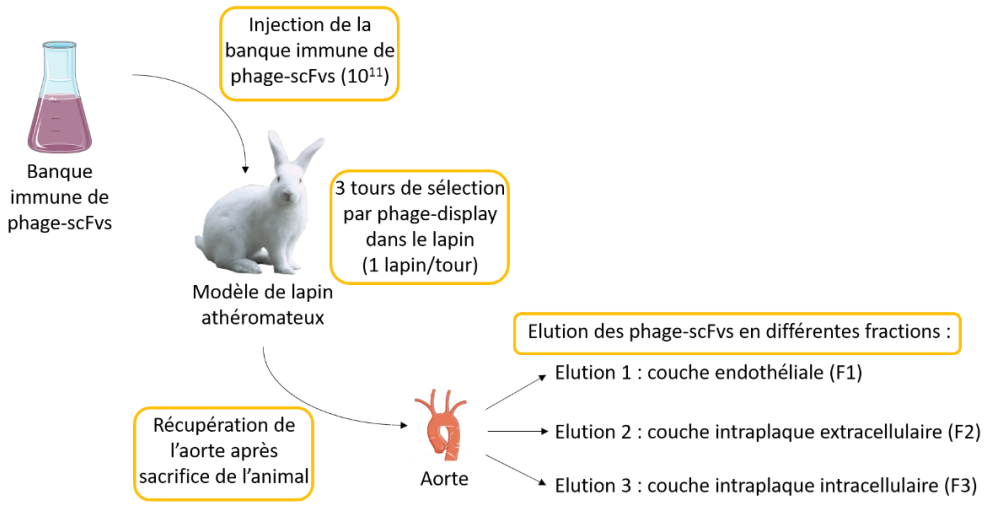


Figure 46 : Schéma de la sélection de phage-scFvs par phage-display dans le modèle de lapin athéromateux. Trois tours de sélection ont été effectués chez le lapin athéromateux. Lors d'un tour de sélection, les phage-scFvs sont injectés dans la circulation sanguine du lapin. Après une heure de circulation, l'animal est sacrifié et l'aorte est récupérée. Les phage-scFvs ont ensuite été élués de différentes fractions : F1 (phage-scFvs récupérés sur la surface endothéliale), F2 (phage-scFvs récupérés dans la plaque en extracellulaire) et F3 (phage-scFvs récupérés dans la plaque au niveau intracellulaire).

La seconde sélection par phage-display est celle réalisée pendant ma thèse sur le modèle de macrophages spumeux que j'ai développé, afin de sélectionner des anticorps ciblant les macrophages spumeux car constitutifs de la plaque d'athérome. La sélection des phage-scFvs sur les macrophages spumeux a été effectuée à partir de la fraction F2 du tour 1 de sélection chez le lapin (Figure 47).

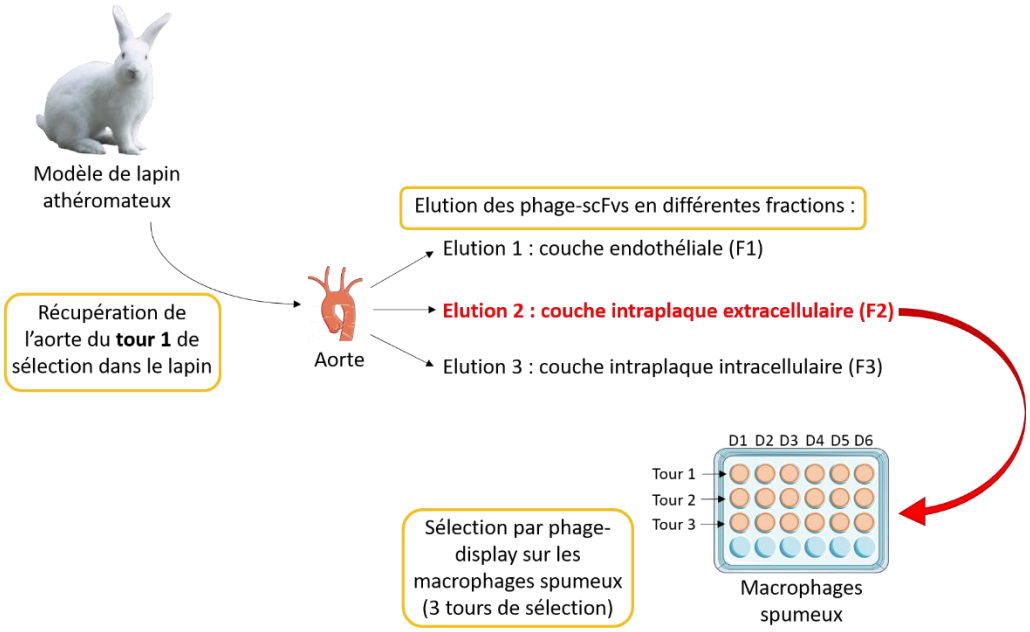


Figure 47 : Schéma de la sélection sur macrophages spumeux à partir de la sélection dans le lapin. La sélection des phage-scFvs sur les macrophages spumeux, issus de six donneurs, a été effectuée à partir de la fraction F2 du tour 1 de sélection chez le lapin. Trois tours de sélection ont également été réalisés pour augmenter la spécificité.

V. B. Etapes de la sélection par phage-display

Production des phages. L'amplification exponentielle des bactéries XL1-blue *E. coli* contenant les phagemides des phage-scFvs sélectionnés chez le lapin (fraction F2, diversité de $2,7.10^6$ phage-scFvs) est réalisée dans un incubateur (Newbrunswick, Edison, USA) à 37°C, 180rpm à partir d'une DO_{600} de 0,1 jusqu'à une DO_{600} entre 0,6 et 0,8 dans 50mL de milieu 2TYATG (bactotryptone 16g/L, extrait de levures 10g/L, NaCl 5g/L, ampicilline 100µg/mL, tétracycline 10µg/mL, glucose 100mM) (pendant 3-4h). Les bactéries amplifiées sont ensuite infectées avec 500µL d'hyperphage M13-KO7 (Progen, Allemagne) (MOI d'environ 10), d'abord 15min à 37°C sans agitation puis 45min à 37°C avec agitation (150rpm). Une centrifugation est ensuite effectuée (10min, 3200rpm) puis le culot bactérien est repris dans du milieu 2TYAKIG (bactotryptone 16g/L, extrait de levures 10g/L, NaCl 5g/L, ampicilline 100µg/mL, kanamycine 50µg/mL, IPTG 0,5mM, glucose 1mM) et mis à incuber toute la nuit à 26°C, 280rpm pour induire la production des phages par les bactéries.

Purification des phages produits. La purification se fait via l'alternance de centrifugations et de précipitations des phages dans une solution de PEG-NaCl (polyéthylène glycol 6000 200g/L, NaCl 146,1g/L) froid. La culture bactérienne contenant les phage-scFvs est centrifugée deux fois afin d'éliminer les débris bactériens. La première centrifugation dure 30min à 6000g à 4°C. Le surnageant est récupéré et à nouveau centrifugé, cette fois 10min, à 8000g à 4°C. Le surnageant est récupéré et purifié par précipitation. Une première précipitation est réalisée toute la nuit à 4°C sous agitation douce avec 0,3 volume de PEG-NaCl froid par rapport au volume total de surnageant. Le lendemain, ce produit de précipitation est centrifugé 30min à 15000g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot contenant les phages est repris dans 10mL de PBS 1X froid avant d'être centrifugé 10min à 12000g à 4°C pour éliminer les débris bactériens résiduels. Puis le nouveau surnageant est récupéré délicatement. La seconde précipitation des phages s'effectue dans 0,15 volume de PEG-NaCl froid par rapport au volume total de surnageant, pendant 2h à 4°C. Une dernière centrifugation est réalisée pendant 20min à 12000g à 4°C. Le culot contenant les phages-scFv purifiés est ensuite repris dans 1mL de PBS 1X froid et filtré sur membrane à 0,2µm. Des dilutions en série (10^{-2} à 10^{-12}) sont effectuées puis mises en présence de bactéries XL1 blue (DO_{600}=0,8) afin que les phages les infectent pour pouvoir les énumérer. L'incubation se fait pendant 30min à 37°C sans agitation, puis les dilutions sont étalées sur des boîtes 2TYAG/agar qui sont ensuite incubées une nuit à 37°C.

Numération des phages-scFv produits. Le lendemain, la concentration en phages-scFv purifiés est déterminée à partir du nombre de colonies ayant poussé par boîte correspondant à chaque dilution, afin de calculer le volume à mettre sur les macrophages spumeux pour le biopanning.

Biopanning. Le biopanning consiste à sélectionner les phages-scFv retenus à la surface des macrophages spumeux. Ces derniers ont été préparés au préalable : ensemencés à 400000/mL, ils ont été cultivés, comme décrit précédemment dans le chapitre I. C. 1), pendant 5-6 jours avant d'être stimulés avec des LDL oxydées et un extrait issu du pool de différentes biopsies carotidiennes de patients pendant 48h, puis lavés et fixés avec du PFA 4% pendant 15min et conservés à 4°C jusqu'aux différents tours de sélection. Ainsi des macrophages issus des mêmes donneurs et présentant le même « état de différenciation et d'activation » ont pu être utilisés pour chacun des trois tours. Avant chaque tour de sélection, les macrophages spumeux des différents donneurs préparés pour chaque sélection dans des plaques séparées, ont été saturés une nuit avec du PBS-lait 2% p/v pour éviter une fixation non spécifique des phage-scFvs sur les macrophages spumeux, c'est-à-dire une fixation n'impliquant pas le paratope VH-VL. Les phage-scFvs purifiés sont dilués dans du PBS 1X froid afin d'avoir une concentration totale de 2.10^{11}phages répartie dans les six puits contenant les macrophages de six donneurs (afin d'augmenter la diversité des cibles). L'incubation avec les macrophages spumeux dure 1h30 à 4°C. Dix lavages de 5min à 4°C, avec agitation douce, en PBS-Tween20 0,1% v/v froid (PBS-T) sont ensuite réalisés suivis de dix lavages en PBS 1X froid afin d'éliminer tous les phage-scFvs qui ne se seraient pas fixés. Les phage-scFvs fixés sur les macrophages sont ensuite élués à l'aide d'une solution acide (200µL de Glycine 0,1M pH2,2) pendant 8min maximum, pour ne pas lyser les scFvs, avant neutralisation au tampon Tris (78µL). Les éluats des différents donneurs sont poolés puis mis en présence des bactéries XL1 blue en phase exponentielle, pendant 15 min à 37°C sans agitation puis 45 min à 37°C avec agitation (150rpm). Les phage-scFvs sélectionnés sont ensuite divisés en deux parties, une partie servira à la titration et à la congélation, et l'autre à la production pour les tours de sélections 2 et 3.

- Pour la titration et la congélation pour les tests de réactivité, les étapes sont les suivantes :
  Cent µL des bactéries contenant les phage-scFvs élués sont utilisés pour réaliser des dilutions sérielles (10^{-1} à 10^{-8}) qui sont étalées sur des petites boîtes de Pétri contenant du 2TYAG/agar afin de titrer les phage-scFvs sélectionnés lors du tour de sélection. Les boîtes de Pétri sont mises à incuber à 30°C pendant deux jours. Les clones bactériens sont ensuite piqués et déposés individuellement dans les puits d'une boîte 96 puits pour culture bactérienne (96-deep well plates masterblock, Greiner bio-one, Dutscher) qui est mise à incuber une nuit à 26°C avec agitation à 260rpm. Le lendemain, l'incubation est poursuivie 1h à 37°C, à 260rpm, puis la boîte masterblock est centrifugée (10min, 5000g) afin de reprendre les culots dans du milieu 2TY-50%glycérol. Une agitation de 10min, 260rpm à 37°C est alors réalisée afin d'obtenir des suspensions homogènes avant de congeler les boîtes masterblock à -80°C pour

leur conservation jusqu'à ce qu'elles soient utilisées pour réaliser ultérieurement un criblage des phage-scFvs spécifiques du modèle de sélection.

- Pour la production des tours 2 et 3, les étapes sont les suivantes :

  Le reste des bactéries contenant les phage-scFvs élués est centrifugé pendant 15min à 4000rpm. Le culot bactérien contenant les phage-scFvs est repris dans 500µL de milieu 2TY qui sont alors étalés sur une grande boîte 2TYAG/agar pour le tour de sélection suivant. Arès une incubation de deux jours à 30°C, le tapis bactérien est gratté en présence de milieu 2TY, centrifugé et remis en culture dans du milieu 2TYATG (DO_{600} < 0,1) à 37°C, 280rpm, jusqu'à une DO_{600} entre 0,6 et 0,8.

Plus on fait de tours de sélection, plus on enrichit en phage-scFvs spécifiques, au risque de perdre légèrement en diversité (perte des phage-scFvs les moins affins). C'est pourquoi, nous avons décidé d'effectuer trois cycles de sélection afin d'enrichir en scFv spécifiques sans trop perdre en diversité. Autrement dit, c'est un compromis entre diversité et spécificité.

V. C. Criblage *in vitro* des phage-scFvs par ELISA

V. C. 1) Production des phage-scFvs

Afin de pouvoir cribler les phage-scFvs pour leur interaction spécifique avec le modèle de macrophages spumeux, les clones bactériens congelés (comme décrits précédemment) contenant les phage-scFvs sélectionnés sont remis en culture. Pour cela, une réplique de la masterblock contenant les clones congelés est réalisée en prélevant, chaque clone avec un pic qui est ensuite déposé dans un puits contenant 500µL de milieu 2TYATG. La masterblock « pré-culture » est incubée à 30°C, 260rpm une nuit. Le lendemain, 10µL de chaque clone sont déposés dans 500µL de milieu 2TYATG et la nouvelle masterblock est incubée pendant 3h à 37°C sous agitation (260rpm). Vingt-cinq µL/puits d'hyperphage (MOI d'au moins 50) sont ensuite ajoutés par puits avant d'incuber la masterblock à 37°C sans agitation pendant 30min puis avec agitation douce (150rpm) pendant 30 min supplémentaires. La masterblock est ensuite centrifugée à 4000g pendant 15min puis chaque culot est repris dans 500µL de milieu 2TYAK. Une incubation d'une nuit à 26°C avec agitation (260rpm) est effectuée. Le lendemain, la masterblock est centrifugée 20min à 4500g puis les surnageants sont transférés dans une nouvelle masterblock qui sera conservée à 4°C pendant maximum une semaine.

V. C. 2) Dosage des phage-scFvs produits (ELISA)

Un ELISA quantitatif est réalisé pour dénombrer les phage-scFvs produits en comparaison avec une gamme étalon de phages auxiliaires. Les puits de plaques 96-puits à fond plat (corning costar, Fischer Scientific, France) ont été recouverts pendant une nuit à 4°C avec un anticorps monoclonal de souris anti-g8p (protéine majoritaire du phage M13) (GE Healthcare, UK) dilué à 5 µg/mL dans un tampon carbonate (carbonate 15 mM, bicarbonate 35 mM/pH 9,6). Après deux lavages (tampon PBS à 0,05% de Tween 20 (PBS-T)), les puits ont été saturés avec du PBS à 5% de lait (p/v) toute la nuit à 4°C. Les dilutions des surnageants des phage-scFvs (1/5ème et 1/10ème) et la gamme d'hyperphage de 5.10^{7} à 1.10^{11} cfu/ml ont été déposées en dupliquât, après quatre lavages (PBS-T), et incubées pendant une heure à température ambiante. Après six lavages (PBS-T), l'anticorps monoclonal murin anti-g8p conjugué à la HRP (GE Healthcare), dilué au 1/5000ème dans du PBS à 2% de lait (p/v), a été ajouté pendant 1 heure à température ambiante. Après six lavages (PBS-T), la couleur a été développée avec le système OPD pour ELISA (SIGMAFAST™ OPD, Sigma-Aldrich). L'absorbance a été lue à 450 nm dans un lecteur de plaque (Chameleon, Thermofisher, France).

V. C. 3) Criblage des phage-scFvs (ELISA)

Le criblage des phage-scFvs issus des tours de sélection par phage-display permet de confirmer ou d'infirmer leur réactivité. Pour cela nous avons choisi de faire un test par ELISA en comparant la fixation des phage-scFvs sur les macrophages non stimulés (M0) et sur les macrophages spumeux. Les macrophages ont été ensemencés à 100000/puits, cultivés comme décrit précédemment dans le chapitre I. C1), pendant 5-6 jours. La moitié des macrophages de la plaque a ensuite été stimulée avec des LDL oxydées (l'autre moitié n'a pas été stimulée : M0) pendant 48h. Ils ont ensuite été lavés et fixés avec du PFA 4% pendant 15min et conservés à 4°C. La veille du criblage, les sites non spécifiques des macrophages fixés ont été saturés en PBS-lait 2% une nuit à 4°C et lavés en PBS 1X. Le lendemain, les phage-scFvs sont déposés sur les macrophages (M0 et spumeux) fixés, à environ 2.10^{9}/puits, et incubés une nuit à 4°C. Une gamme contrôle d'hyperphage (5.10^{8}-5.10^{10}) correspondant au range de concentration des phage-scFvs, ainsi que des anticorps anti-CD86, anti-CD36 et anti-CD206 sont également déposés. Après six lavages en PBS 1X, un anticorps primaire de souris anti-g8p est déposé pendant 1h à 4°C, suivi de trois lavages en PBS 1X et du dépôt de l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris couplé à la HRP pendant 1h à 4°C. Six autres lavages sont réalisés avant la révélation OPD pour ELISA (SIGMAFAST™ OPD, Sigma-Aldrich). L'absorbance est lue à 450 nm dans un lecteur de plaque (Chameleon, Thermofisher). La fixation non spécifique des phages est déterminée grâce à la gamme d'hyperphage. La DO obtenue dans les puits contenant l'hyperphage à la même concentration que les phage-scFvs est soustraite de la DO obtenue avec les phage-scFvs spécifiques.

Références :

1. Mondon P, Souyris N, Douchy L, Crozet F, Bouayadi K, Kharrat H. Method for generation of human hyperdiversified antibody fragment library. Biotechnol J. 2007 Jan;2(1):76–82.

2. Mondon, P., Bouayadi, K., Kharrat, A. & Millegen. *Bibliothèques d'anticorps hautement diversifiées* (2006).

Résultats & Discussion

Objectifs de la thèse :

L'objectif principal du projet est de sélectionner des anticorps ciblant les macrophages spumeux spécifiques des plaques d'athérome afin qu'ils puissent être utilisés ultérieurement pour développer de nouvelles stratégies de diagnostic et de thérapie des plaques à risque de rupture.

Le développement de modèles cellulaires expérimentaux est essentiel car ceux-ci permettent d'étudier de manière simplifiée le rôle des différentes sous-populations de macrophages dans la plaque. Cette représentation est néanmoins imparfaite car elle occulte la complexité du microenvironnement des plaques. Ainsi les modèles inflammatoire (M1) et immunorégulateur (M2) miment des macrophages à l'extrême de leur polarité fonctionnelle et sont vraisemblablement plus polarisés que ces mêmes types de macrophages présents *in vivo*. De la même manière, des modèles de macrophages spumeux basés sur une stimulation « simple » utilisant seulement soit des LDL oxydées, soit des LDL acétylées, ont été décrits dans la littérature et là encore sans tenir compte du microenvironnement complexe de la plaque.

Lors de ma thèse, j'ai, dans un premier temps, développé un modèle physiopathologique de macrophages spumeux. Afin de mimer le micro-environnement des macrophages spumeux présents *in vivo*, la stimulation des macrophages a été réalisée avec des LDL oxydées (LDLox) associées à des extraits de plaques d'athérome issues de carotides humaines. Ces biopsies ont été obtenues auprès du Pr. Éric Ducasse, chef du service de chirurgie vasculaire à l'hôpital Pellegrin.

Nous avons ensuite caractérisé ce modèle au niveau phénotypique et métabolique en le comparant aux modèles inflammatoire (M1) et immunorégulateur (M2) ainsi qu'aux autres modèles de macrophages spumeux (LDLox seules, LDL acétylées (LDLac) avec ou sans cet extrait carotidien (EC)). L'étude du phénotype a été faite par cytométrie en flux en utilisant un panel de six anticorps ciblant des marqueurs inflammatoires et immunorégulateurs. L'étude métabolique a été réalisée en collaboration avec deux laboratoires. La première, établie avant mon arrivée, avec un laboratoire de biophysique à Limoges (XLIM), nous a permis de travailler sur l'observation d'intermédiaires du métabolisme auto-fluorescents. La seconde collaboration a été initiée, à la suite de discussions abordées lors de ma mi-thèse, avec le Dr. Johan Garaude, spécialiste du métabolisme des macrophages et chercheur au sein du laboratoire MRGM (Maladies Rares : Génétique et Métabolisme) à Bordeaux. A travers cette collaboration, nous avons été initiées à l'étude du métabolisme via l'utilisation d'un appareil de mesure des flux extracellulaires (Seahorse) permettant de détecter la respiration des cellules ainsi que leur état glycolytique.

Après avoir caractérisé notre modèle de macrophages spumeux en le comparant aux modèles M1 et M2 (partie 1A), puis en approfondissant son analyse en le comparant aux autres modèles de macrophages spumeux développés (Partie 1B), nous avons souhaité isoler des anticorps ciblant ce modèle physiopathologique (Partie 2). J'ai donc, dans un second temps, effectué une expérience de phage-display sur ce modèle à partir d'une banque de phage-scFvs spécifiques de la plaque d'athérome, établie dans un modèle de lapin athéromateux par l'équipe avant mon arrivée. Ces anticorps spécifiques permettront de poursuivre la caractérisation phénotypique et fonctionnelle de ce modèle physiopathologique, essentielle à la compréhension du rôle des macrophages spumeux dans la pathogénèse, en révélant par exemple de nouveaux biomarqueurs. De plus, les anticorps capables de reconnaître spécifiquement les macrophages spumeux *in vivo* pourraient être utiles dans le diagnostic de l'athérosclérose en ciblant une population impactant la stabilité de la plaque. Enfin, de nouvelles approches d'immunothérapies de l'athérosclérose peuvent être envisagées en sélectionnant un anticorps capable d'agir directement sur la fonction (amélioration de l'efflux de cholestérol ou induction d'une immunorégulation par exemple) ou en apportant une drogue *in situ* au plus près de sa cible.

I. Etude du modèle de macrophages spumeux

L'intérêt et l'originalité de notre étude porte sur le développement d'un modèle physiopathologique de macrophages spumeux. En effet, les nombreuses études sur les macrophages dans l'athérosclérose portent soit sur les macrophages inflammatoires et immunorégulateurs, soit sur les macrophages spumeux. Il est maintenant admis que les macrophages constituent une population très plastique capable de réagir à son environnement en changeant de phénotype et de fonction. Notre modèle de macrophages spumeux est basé sur une stimulation avec des LDLox – plus physiologiques que les LDL acétylées – avec en plus des extraits de biopsies obtenues après endartériectomies afin de mimer le microenvironnement complexe des plaques d'athérome dans lequel de nombreux stimuli sont présents. Dans notre étude, les macrophages que l'on nomme M1 et M2 ont été utilisés en tant que modèles pour étudier les marqueurs inflammatoires et immunorégulateurs. Nous avons choisi de travailler sur des macrophages humains pour identifier des anticorps dirigés contre des cibles utiles dans de nouvelles stratégies de diagnostic et de thérapie de l'athérosclérose chez l'Homme, mais aussi par ce que des différences notables ont pu être observées entre les monocytes humains et murins. Par exemple, alors que les monocytes murins sont constitués de 50% de monocytes classiques et de 50% de monocytes non-classiques, chez l'Homme, ces pourcentages sont de 80% et 10% respectivement (1). Ainsi, nous n'aurions probablement pas obtenu les mêmes résultats en termes de phénotype et de fonction à partir de monocytes murins étant donné que nous avons isolé l'ensemble des monocytes pour obtenir nos modèles de macrophages.

I. A. Comparaison de notre modèle physiopathologique de macrophages spumeux avec les modèles M1 et M2

I. A. 1) Etude de leur morphologie et analyse de leur prise en charge des LDLox, après coloration par microscopie en contraste de phase

L'observation en microscopie optique nous a permis de distinguer différents morphotypes pour chacun des modèles mis en place : les cellules M1 sont plutôt fines et allongées tandis que celles du modèle M2 sont plutôt rondes et plates présentant, comme cela a souvent été décrit, un aspect d'« œuf au plat ». Les macrophages de notre modèle physiopathologique sont, quant à eux, très granuleux et globalement ronds avec des bords irréguliers.

Afin de valider notre modèle de macrophage spumeux, nous avons vérifié qu'ils avaient bien internalisé les LDLox. Pour cela nous avons marqué les lipides avec un colorant liposoluble (Oil Red O) (Figure 48).

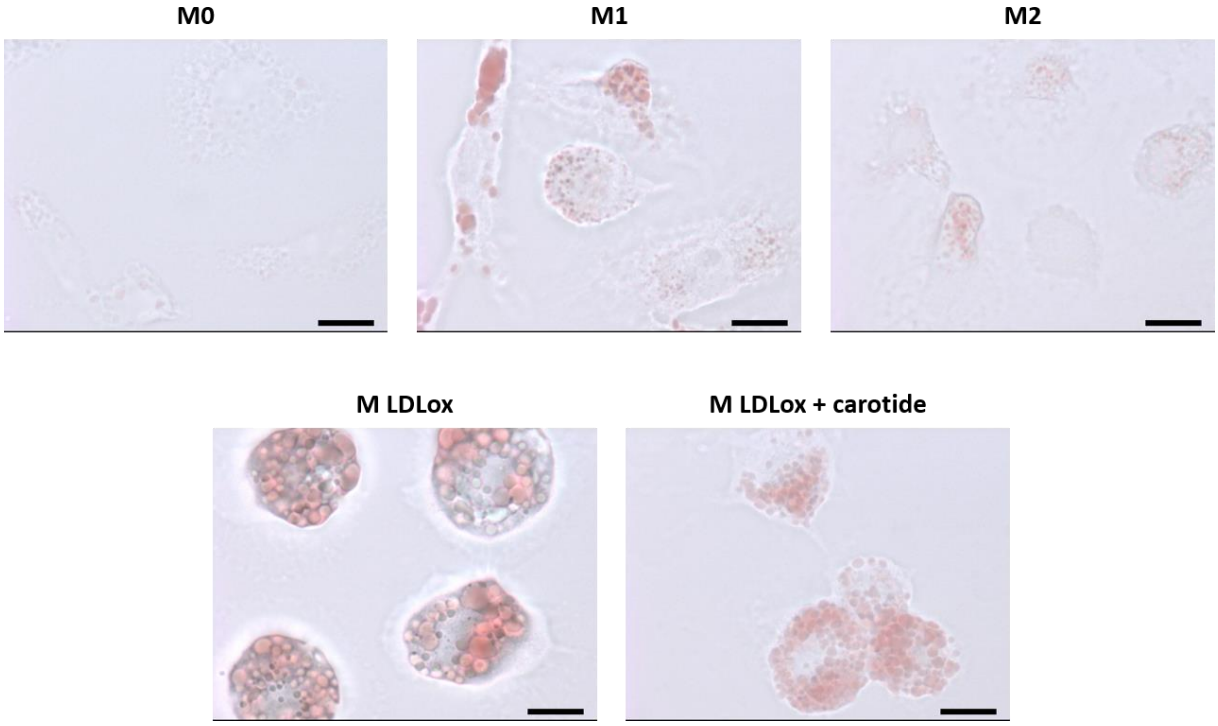


Figure 48 : Marquage des lipides cellulaires au Oil red O. Temps d'incubation avec l'Oil red O = 30sec. Barre d'échelle = 20µm. Grossissement = 63X à immersion

A la suite de leur incubation en présence de LDLox avec ou sans extraits de carotides, les macrophages spumeux obtenus présentent plus de marquage rouge que dans les autres conditions, confirmant qu'ils ont bien internalisé les LDLox. Nous avons également observé un marquage rouge, plutôt fort dans les M1 et très léger dans les M2, bien que plus faible que dans les macrophages spumeux. D'après les données de la littérature synthétisées dans le chapitre III de l'introduction, les lipides des M1 proviennent principalement de leur synthèse intracellulaire tandis que ceux des M2 proviennent majoritairement de leur internalisation, probablement à partir des acides gras présents dans le sérum AB. Pour vérifier cette dernière affirmation il faudrait faire une expérience avec du sérum AB délipidé pour comparer si les M2 perdent toute leur coloration rouge. Par ailleurs, on remarque que les gouttelettes lipidiques rouges sont plus grosses dans les M1 (en particulier dans la cellule allongée sur la gauche qui a une forme caractéristique des M1) que dans les M2. Concernant les macrophages spumeux, les gouttelettes lipidiques sont plus grosses dans le modèle stimulé avec les LDLox seules que dans le modèle stimulé avec les LDLox et les extraits de carotide. Les macrophages stimulés avec les LDLox semblent avoir des gouttelettes plus proches de celles des M1, tandis que les macrophages stimulés avec les LDLox+EC semblent avoir des gouttelettes plus proches de celles des M2. Une étude a également montré que les macrophages M2 (caractérisé par la présence du marqueur CD206)

possédaient de petites gouttelettes lipidiques tandis que les cellules CD206- possédaient des grosses gouttelettes (2). Cependant dans cette étude, ils n'ont pas démontré si les cellules CD206- sont inflammatoires et/ou spumeuses. Ils ont en revanche montré qu'elles étaient présentes dans une zone de la plaque caractérisée par la présence des M1.

I. A. 2) Etude de l'expression des marqueurs inflammatoires et immunorégulateurs

Afin de mieux définir les macrophages spumeux de la plaque d'athérome, nous avons mis au point différents modèles de macrophages spumeux et les avons comparés aux modèles de macrophages inflammatoires (M1) et immunorégulateurs (M2). Les cellules ont été marquées avec un cocktail d'anticorps ciblant des marqueurs de surface de type pro-inflammatoires (CD40, CD86 et CD197) et anti-inflammatoires (CD163, CD206 et CD200R). Pour chaque condition de stimulation et pour chaque marqueur, le pourcentage de cellules positives (Figure 49) et le niveau d'expression - exprimé par la MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) - (Figure 50) ont été étudiés.

Les résultats de cytométrie en flux sont décrits de manière détaillée dans notre article récemment publié dans la revue *Atherosclerosis*, à partir de mes résultats de thèse, et intitulé « Two-Photon-Excited Fluorescence (TPEF) may be useful to delimit macrophage subsets based on their metabolic activity and cellular responses in atherosclerotic plaques ».

Dans un premier temps, les données de pourcentage de cellules positives et de MFI ont été étudiées marqueur par marqueur. Concernant les marqueurs inflammatoires, les CD40 et CD86 sont exprimés par la plupart des macrophages M1. La majorité des cellules des autres modèles les expriment également mais avec un pourcentage significativement moins élevé que pour les M1 (p^* à p^{***}) (Figure 49A et B). Quant au CD197, il n'est quasiment pas exprimé par les modèles mis à part les M1 dont le pourcentage de cellules positives est significativement supérieur à celui des autres modèles (p^{**} à p^{***}) et frôle les 40% (Figure 49C). Le niveau d'expression du CD40 et du CD86 dans les M1 est significativement plus élevé que dans les autres cellules (trois à quatre fois plus, p^{***}) (Figure 50A et B) tandis qu'aucune différence n'est observée pour le CD197 (Figure 50C).

Concernant les marqueurs immunorégulateurs, le CD206 est exprimé par la quasi-totalité des macrophages M2, et la majorité des autres cellules (p^* à p^{***}) (Figure 49E). Le CD200R est exprimé par les trois quarts des macrophages M2 avec une forte différence significative (p^{***}) avec les autres cellules qui l'expriment peu (Figure 49F). Quant au CD163, il ne ressort pas comme un marqueur spécifique des M2 : en moyenne, la moitié des cellules de tous les modèles l'exprime (Figure 49D). Il

est à noter la différence vis-à-vis de la publication de Mendoza-Coronel et Ortega, dans laquelle leur modèle stimulé avec de l'IL-10 exprime le CD163 (3). Le niveau d'expression du CD206 dans les M2 est significativement supérieur (*p****) aux autres cellules, environ deux fois plus (Figure 50E). Le niveau du CD200R ressort également dans les M2 mais moins fortement que pour le CD206 (Figure 50F). Le niveau d'expression du CD163 ne varie pas à la surface des cellules, quel que soit le modèle (Figure 50D).

Concernant les macrophages spumeux, aucun marqueur ne ressort particulièrement ; ils sont tous exprimés à un niveau basal. Cependant des tendances ont été remarquées entre les modèles de macrophages spumeux. Tout d'abord, concernant le pourcentage de cellules positives pour le CD86 (Figure 49B), une différence statistique a été montrée entre le modèle M1 et les modèles stimulés avec des LDL acétylées, avec et sans extrait carotidien (EC) tandis qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les M1 et les modèles stimulés avec des LDL oxydées (avec et sans EC). Néanmoins aucune différence significative directe entre ces deux types de modèles (basés sur l'utilisation de LDLox ou de LDLac) n'a pu être observée. Ainsi, on ne peut qu'extrapoler la tendance suivante : la stimulation avec les LDLox semble induire un profil plus proche des M1 que des M2. Cette tendance semble se confirmer par l'étude du pourcentage de cellules positives pour le CD206 puisque la différence entre les modèles stimulés avec les LDLac (avec et sans EC) et le modèle M2 est associée à une p value *p**(<0.05) tandis que cette différence présente une p value *p**** (<0.001) entre les modèles stimulés avec les LDLox (avec et sans EC) et le modèle M2. Ainsi, la tendance observée va dans le sens d'un rapprochement entre les modèles stimulés avec les LDLac et le modèle M2 et un éloignement entre les modèles stimulés avec les LDLox et le modèle M2.

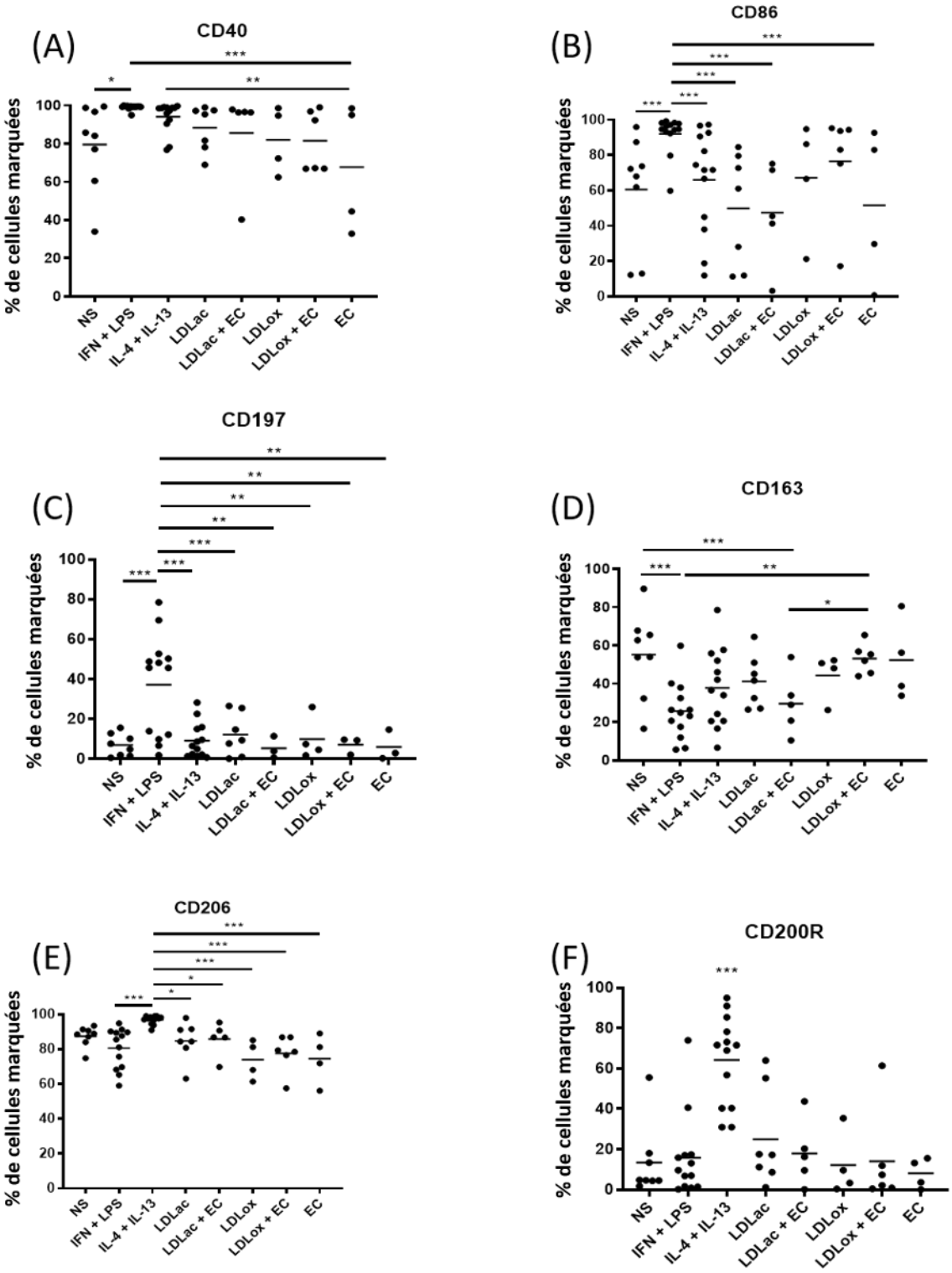


*Figure 49 : Analyse de la présence des marqueurs inflammatoires et immunorégulateurs à la surface des macrophages issus des différents modèles. Pourcentage de cellules positives, dispersion et statistiques sont présentés pour les marqueurs inflammatoires (CD40 (A), CD86 (B), CD197 (C)) et immunorégulateurs (CD163 (D), CD206 (E), CD200R (F)). * p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001. LDLac = LDL acétylées, LDLox = LDL oxydées, EC = extrait carotidien*

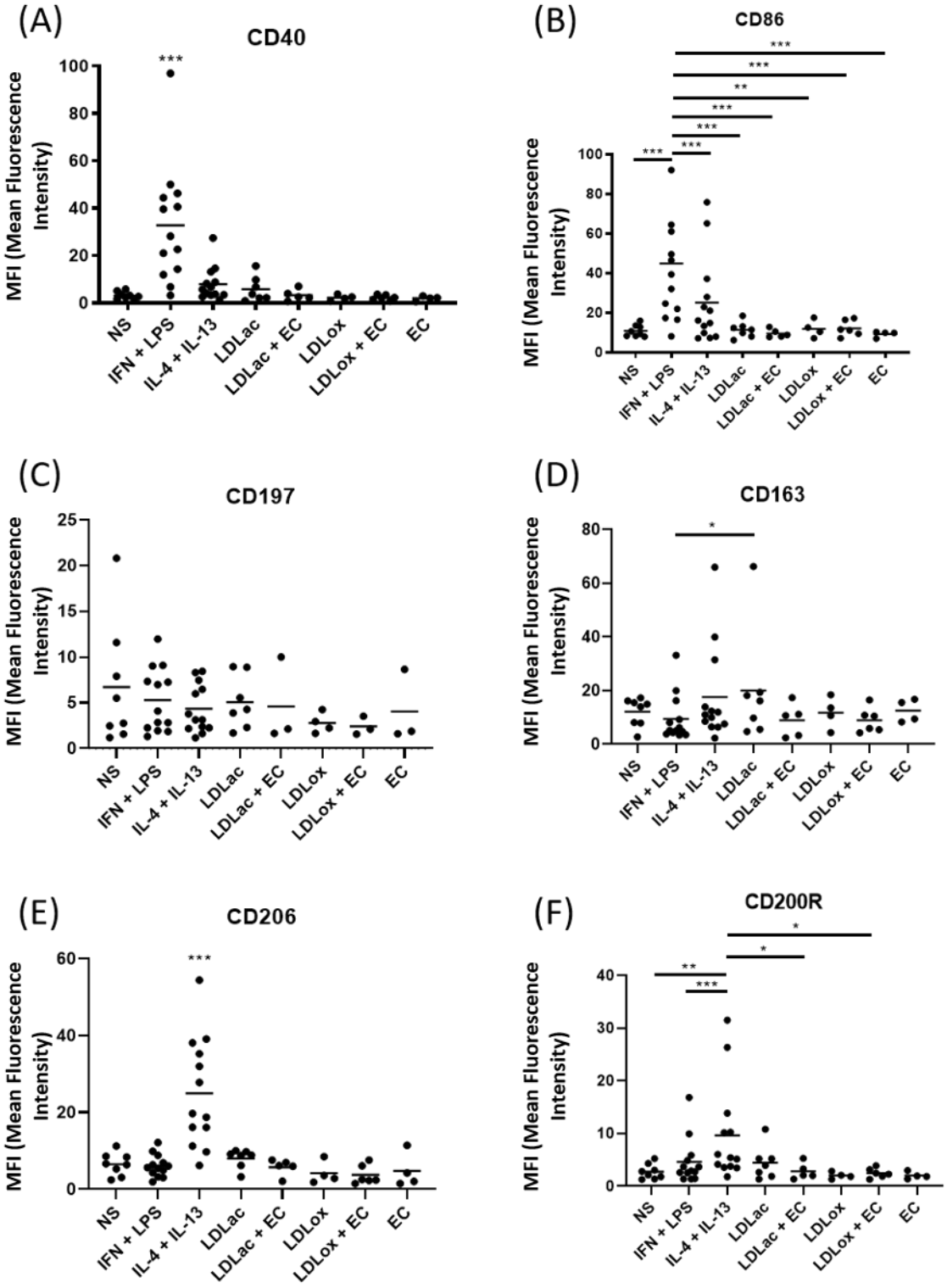


*Figure 50 : Analyse du niveau d'expression des marqueurs inflammatoires et immunorégulateurs à la surface des macrophages issus des différents modèles. MFI (intensité moyenne de fluorescence), dispersion et statistiques des marqueurs inflammatoires (CD40 (A), CD86 (B), CD197 (C)) ou immunorégulateurs (CD163 (D), CD206 (E), CD200R (F)) sur les cellules positives. * p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001. LDLac = LDL acétylées, LDLox = LDL oxydées, EC = extrait carotidien*

Dans un second temps, nous nous sommes focalisées sur les marqueurs inflammatoires et immunorégulateurs les plus robustes dans notre analyse, c'est à dire sur les marqueurs CD40, CD86 et CD206. Afin de mieux visualiser la coexpression de ces marqueurs sur nos modèles cellulaires, nous avons réalisé les nuages de points montrant une représentation en 2D des fluorescences observées sur les cellules pour les marqueurs CD40 et CD206 (Figure 51A) ainsi que pour les marqueurs CD86 et CD206 (Figure 51B). Ainsi, nous avons pu observer une répartition en nuage de points des cellules au sein des différents modèles permettant de distinguer les modèles de macrophages M1, M2 et spumeux (LDL+EC). Cette Figure 51 a été réalisée à partir des données obtenues pour un donneur représentatif de l'étude. On peut alors observer que le modèle M1 exprime plus de CD40 que l'ensemble des M2 et des spumeux et plus de CD86 qu'une bonne partie des M2 et des spumeux. Le CD206 est plus exprimé par les M2 que les M1 et les spumeux. Quant aux macrophages spumeux, on peut voir qu'ils coexpriment ces ceux types de marqueurs à un niveau basal.

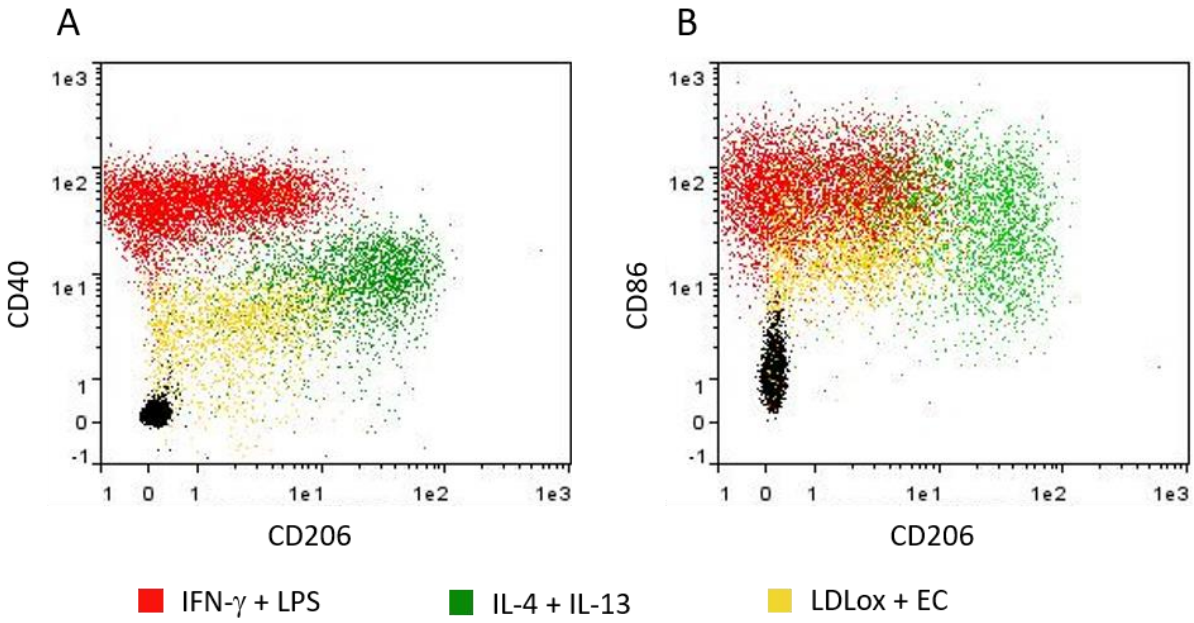


Figure 51 : Superpositions des nuages de points des macrophages stimulés par l'IFN-γ+LPS (M1), l'IL-4+IL-13 (M2) ou les LDLox+EC (macrophages spumeux) après multi-marquage et passage en cytométrie en flux. (A) Diagramme de dispersion représentatif des MFI obtenues avec les anticorps anti-CD40 et anti-CD206. (B) Diagramme de dispersion représentatif des MFI obtenues avec les anticorps anti-CD86 et anti-CD206. Cette représentation a été faite à partir des données d'un donneur.

Le choix des marqueurs est d'une importance capitale dans l'interprétation des résultats. En effet de nombreuses études se sont, par le passé, focalisées sur un seul de ces marqueurs, rendant difficile leur interprétation et leurs comparaisons notamment lorsque le marqueur choisi pour identifier le type inflammatoire ou le type immunorégulateur varie (Tableau 9).

Tableau 9 : Marqueurs utilisés dans la littérature pour caractériser les modèles M1 et M2

Marqueurs M1	**Marqueurs M2**	**Référence**
CD68, CD11c	CD163	(4)
CD11c	CD206	(5)
	CD163, CD206, arg1	(6)
	CD68, CD206 (MR)	(2)
	CD206, CD163	(7)
CD86	CD163	(8)
CD64, CD40	CD206, CD163	(9)
	CD206, CD200R	(10)

Ainsi, il a été montré que l'utilisation d'un seul marqueur pour étudier les sous-types de macrophages était très réducteur (4). Face à cette confusion, nous avons donc décidé de travailler avec six marqueurs afin de valider le profil pro- ou anti-inflammatoire de nos modèles. Nous avons choisi de combiner les marqueurs les plus souvent décrits pour caractériser les modèles M1 (CD40, CD86 et CD197) et M2 (CD163, CD206 et CD200R).

La dispersion des valeurs de pourcentage et de MFI observée entre les donneurs est assez élevée pour certains marqueurs ou certaines conditions. Ces variations sont dues au fait que les monocytes que l'on récupère de leur sang ne sont pas tous dans le même état d'activation. En effet, même si les donneurs sont en bonne santé d'après le questionnaire du don du sang, ils n'ont pas tous le même mode de vie, le même âge, le même état de santé. Dans la littérature, il a été remarqué des similarités entre les facteurs de risque cardiovasculaires et ceux induisant un état inflammatoire des monocytes. Par exemple, il a été montré qu'à un âge avancé la capacité de renouvellement des macrophages tissulaires dérivés de l'embryogenèse diminue ce qui implique le recrutement de monocytes circulants inflammatoires (11). Les monocytes isolés du sang de personnes âgées peuvent donc induire des macrophages plus inflammatoires que ceux récupérés du sang de personnes jeunes. L'alimentation participe également à l'état inflammatoire des monocytes. Il est bien connu qu'une alimentation riche en lipides saturés, protéines animales, cholestérol et sels (comme le régime occidental) induit une inflammation systémique conduisant à une reprogrammation des précurseurs myéloïdes. Les monocytes produits sous ce régime alimentaire seront davantage inflammatoires qu'avec une alimentation saine. De plus, il a été montré que même si les personnes reviennent à une bonne alimentation, les monocytes seront toujours davantage inflammatoires, c'est ce qu'on appelle l'immunité entraînée (*Trained Immunity*) (12,13) ; comme une sorte de mémoire de l'immunité innée. Plus précisément, il a été montré que ce sont les LDLox (provenant d'une alimentation riche en lipides

saturés) qui induisent un profil inflammatoire chez les monocytes et les macrophages, via la production de cytokines pro-inflammatoires à long terme (14). À la suite de ces lectures, j'ai observé l'état des plasmas des donneurs (lors des expériences de séparation sur Ficoll), et j'ai remarqué des différences dans la turbidité des plasmas. Or, un plasma trouble est synonyme de nourriture grasse et riche en protéines animales. Malheureusement ces lectures sont arrivées après les expériences de cytométrie en flux, je n'ai donc pas pu faire le lien entre la turbidité du plasma et les résultats de phénotypage.

I. A. 3) Etude des cytokines de type 1 et de type 2 produites dans les surnageants cellulaires et dosées par ELISA

La fonction de nos différents modèles a été évaluée via l'étude de leur profil de sécrétion cytokinique. Nous avons choisi de cibler trois cytokines principales : Il-6 et TNF-α (inflammatoires) et IL-10 (anti-inflammatoires) (Figure 52). Ces résultats sont issus de quatre donneurs (deux expériences dont les valeurs brutes sont en annexe), et il faudrait d'autres donneurs pour pouvoir réaliser des analyses statistiques.

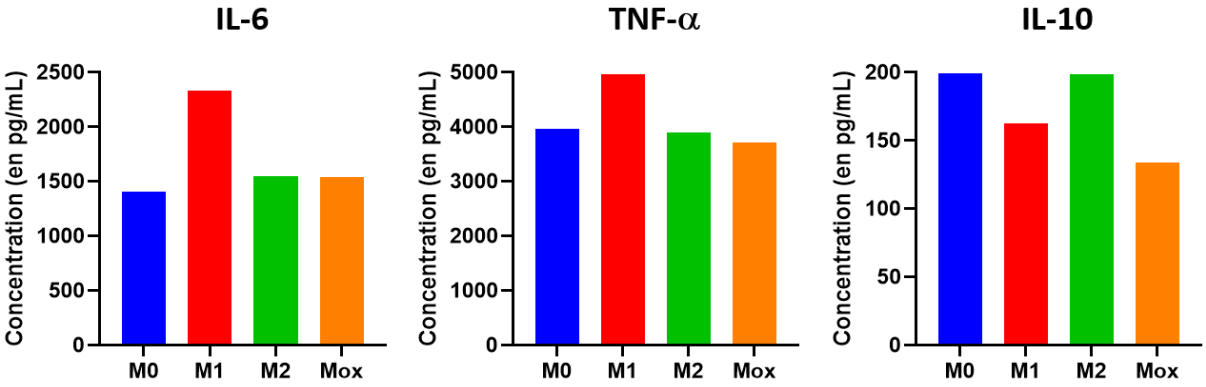


Figure 52 : Profil cytokinique dans les surnageants cellulaires des macrophages. Les macrophages M0 (non stimulés), M2 (anti-inflammatoires) et Mox (stimulation avec des LDLox) ont un profil cytokinique équivalent avec une sécrétion d'environ 1000pg/mL d'IL-6, 2300pg/mL de TNF-a, et un niveau basal d'IL-10. Les macrophages M1 (pro-inflammatoires) sécrètent un niveau basal d'IL-10 mais beaucoup plus d'IL-6 et de TNF-α que les autres conditions, soit environ 5500pg/mL d'IL-6 et 7200pg/mL de TNF-α. n=4.

Nous avons pu observer que les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF-α sont fortement sécrétées par les macrophages pro-inflammatoires M1 par rapport aux autres conditions. Concernant la cytokine IL-10, elle n'a pas du tout été retrouvée dans nos modèles, ni dans les macrophages anti-inflammatoires, ni dans les autres modèles. La cytokine IL-10 est pourtant bien connue pour être produite par les M2, et nos macrophages M2 ont bien un profil d'expression anti-inflammatoire (validé par l'expression des marqueurs de surface) ; ils sont donc bien activés. L'absence d'IL-10 dans leur surnageant est probablement due au fait que la sécrétion d'IL-10 nécessite un autre type de stimuli que ceux que nous avons utilisés pour le modèle M2, à savoir IL-4 et IL-13. Là encore, le modèle d'Ortega montre que la sécrétion d'IL-10 est induite par la stimulation avec l'IL-10 (3).

I. A. 4) Comparaison de leur métabolisme

I. A. 4) a) Etude des propriétés optiques basées sur la détection du NADH et du FAD en microscopie biphotonique

Le NADH (nicotinamide adenine dinucleotide réduit) et le FAD (flavin adenine dinucleotide oxydé) sont des intermédiaires qui permettent de fournir des électrons à de nombreuses réactions chimiques, comme présenté dans le chapitre III de l'introduction. De plus, ils sont naturellement autofluorescents et servent de biomarqueurs de l'état rédox de la cellule (15). Même si d'autres molécules, telle que le NADPH, contribuent à la fluorescence, il a été montré que cette contribution est faible, et que la majorité du signal de fluorescence *in vivo* provient du NADH (16). L'observation de ces intermédiaires a été réalisée par microscopie à fluorescence excitée à deux photons ou TPEF (*Two-photon excited fluorescence*). Cette technique permet grâce à deux photons d'énergie moindre d'atteindre le niveau énergétique d'un photon (utilisé classiquement en microscopie mono-photonique). L'intérêt de cette technique est qu'elle est moins nocive pour les cellules, du fait de son énergie moindre, et qu'elle permet d'aller exciter plus profondément dans les tissus.

Les résultats de microscopie bi-photonique sont décrits de manière détaillée dans notre article publié dans la revue *Atherosclerosis*.

L'imagerie optique biphotonique a permis d'observer l'autofluorescence du NADH et du FAD dans les macrophages. La superposition des images de l'autofluorescence du NADH (filtre vert) et de l'autofluorescence du FAD (filtre rouge) a permis de mettre en évidence une différence de l'intensité de fluorescence dans le canal du NADH et dans celui du FAD entre les conditions M1, M2 et spumeux (Figure 53A, B et C) permettant de différencier optiquement ces trois conditions de stimulations. Les macrophages M1 présentent une forte fluorescence dans le canal du NADH et une faible fluorescence dans le canal du FAD (images brutes non montrées) d'où la couleur verte observée lors de la superposition des images (Figure 53A). Les M2 présentent une fluorescence moyenne dans les deux canaux, résultant, après superposition des images acquises dans les deux canaux, en une coloration jaune des cellules (Figure 53B). Enfin les macrophages spumeux présentent une très forte fluorescence dans le canal du FAD ainsi qu'une forte fluorescence dans le canal du NADH (images brutes non montrées), dont la superposition permet de visualiser une coloration en rouge des cellules dans la Figure 53C.

A partir des différentes images acquises en microscopie, l'intensité de fluorescence du NADH et du FAD a été mesurée pour plusieurs centaines de cellules par condition pour chaque donneur. Comme pour la cytométrie en flux, une représentation en 2D de l'intensité des deux autofluorescences, NADH et FAD, pour chaque cellule d'une condition de stimulation donnée permet de distinguer nettement,

pour un donneur représentatif, les populations M1, M2 et spumeuses représentées par des nuages de points de couleurs distinctes (rose, vert, et jaune respectivement) (Figure 53D). A noter que les cellules des modèles spumeux présentent une dispersion plus importante révélant une plus grande hétérogénéité de ces populations de macrophages par rapport aux modèles M1 et M2.

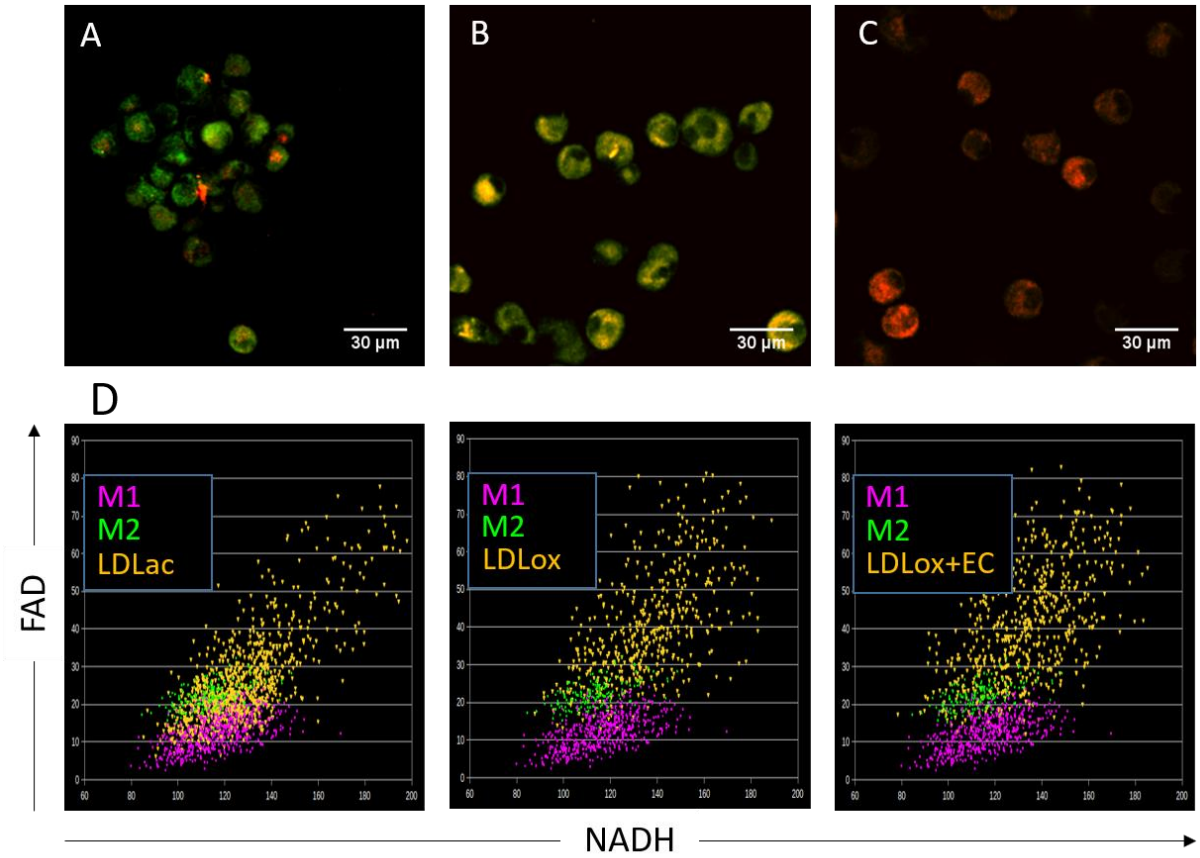


Figure 53 : Lectures optiques de l'autofluorescence du NADH et du FAD dans les macrophages. (A-C) Superposition des images d'autofluorescence du NADH (vert) et du FAD (rouge) pour les macrophages stimulés avec de l'IFN-γ+ LPS (A), de l'IL-4 + IL-13 (B) ou des LDLox + EC (C). Ces trois sous-populations présentent des proportions différentes de NADH et de FAD. Les barres d'échelle représentent 30 µm. (D) Les diagrammes de dispersion de l'autofluorescence du FAD par rapport à l'autofluorescence du NADH permettent une distinction visuelle des populations de macrophages M1 (IFN-γ+ LPS), M2 (IL-4 + IL-13) et différents modèles de macrophages spumeux.

A partir de ces mesures de fluorescence du NADH et du FAD, nous avons voulu comparer les différents modèles pour l'ensemble des donneurs analysés. Cependant, étant donné que nous n'avons pas pu quantifier le NADH et le FAD liés à leur autofluorescence, le seul moyen de comparer les donneurs entre eux a été de calculer des ratios de fluorescence car il n'est pas possible de comparer des valeurs de fluorescence obtenues sur plusieurs expériences (à cause des variations de puissance du laser). Les ratios ont été faits pour chaque donneur, et pour chaque condition les valeurs de fluorescence ont été normalisées par celle de la condition M1. Ainsi, les variations de fluorescence des autres conditions par rapport aux macrophages M1 ont été déterminées (Figure 54). Les résultats traités de cette manière sont représentés pour l'autofluorescence dans le canal du NADH dans la Figure 54A et dans celui du FAD dans la Figure 54B. La Figure 54C présente le ratio rédox optique (ORR), c'est-à-dire le

ratio de l'autofluorescence du FAD divisé par celle du NADH (Figure 54C). A noter qu'il s'agit d'une représentation alternative au ratio redox réel : FAD/(NADH+FAD) (17) étant donné que nous n'avons pas pu déterminer les concentrations de NADH et FAD.

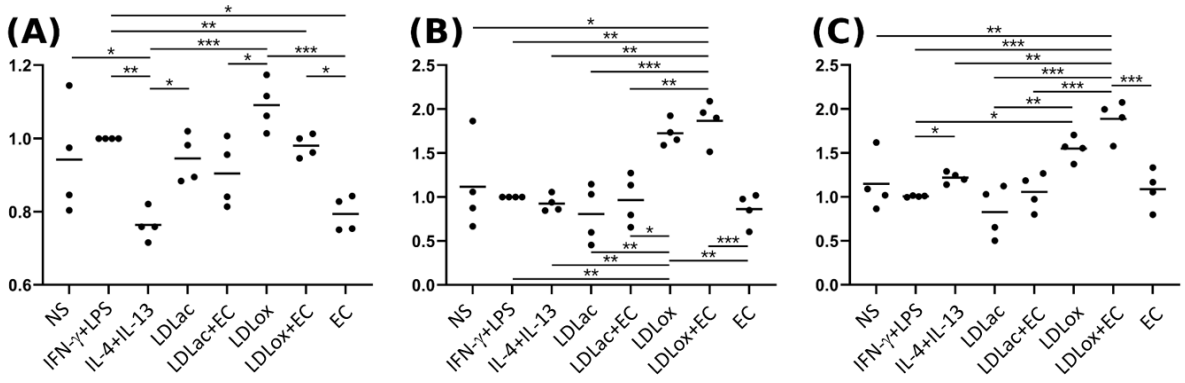


Figure 54 : Mesure et analyse de la fluorescence NADH et FAD en fonction de la polarisation des macrophages. Normalisation de l'autofluorescence NADH (A) et FAD (B) pour les différents modèles de macrophages. (C) Normalisation des ratios rédox optiques (ORR) pour les différents modèles de macrophages.

De ces différents ratios, il ressort que l'autofluorescence NADH est présente davantage dans les M1 et macrophages spumeux (LDLox+EC) que dans les M2 et macrophages spumeux stimulés avec des LDLox, LDLac^{+}/$_{-}$EC ou EC seuls. L'intensité de fluorescence du FAD s'est révélée extrêmement proche entre les M1, les M2 et les macrophages stimulés avec des LDLac^{+}/$_{-}$EC ou EC seuls, mais deux fois plus élevée dans les macrophages stimulés avec des LDLox^{+}/$_{-}$EC. Concernant l'ORR, c'est le modèle physiopathologique LDLox+EC qui possède l'ORR le plus élevé, suivi par les macrophages stimulés avec les LDLox.

D'après ces observations, nous nous sommes demandé si les macrophages spumeux (stimulés par les LDLox^{+}/$_{-}$EC) n'avaient finalement pas un métabolisme utilisant la respiration mitochondriale, ce qui pourrait potentiellement expliquer cette forte autofluorescence dans le canal du FAD puisque la production de ce dernier est, en partie, reliée au complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. Pour répondre à cette question, nous nous sommes tournées vers l'étude du métabolisme énergétique via la mesure de la respiration cellulaire par Seahorse et via le dosage de l'ATP.

I. A. 4) b) Etude de la respiration cellulaire par analyse Seahorse et dosage de l'ATP

L'étude du métabolisme cellulaire constitue un aspect nouveau au sein de notre équipe et nous nous sommes, pour cela, rapprochées du Dr Johan Garaude qui possède une expertise approfondie dans l'étude des flux du métabolisme énergétique dans les macrophages humains et murins. Ainsi, nous avons pu être initiées à la technologie du Seahorse et au dosage de l'ATP produits dans les différentes voies du métabolisme. Afin de mettre au point ces études, je me suis concentrée sur l'étude du métabolisme des macrophages spumeux stimulés avec seulement des LDLox afin de faire la preuve de concept qui sera appliquée ultérieurement sur le modèle physiopathologique des macrophages spumeux stimulés avec LDLox+EC.

Les mitochondries sont des organelles indispensables au métabolisme énergétique cellulaire. Lorsque celles-ci sont dysfonctionnelles, cela induit de nombreuses maladies touchant au moins 1 personne sur 5000 (18). Or, il est reconnu que les cellules inflammatoires ont des mitochondries peu fonctionnelles (19). L'étude de la respiration cellulaire, et donc de l'état des mitochondries, permet donc de faire le lien avec la fonction des cellules.

A partir des résultats issus du Seahorse, la consommation en oxygène ainsi que l'acidification du milieu pour chaque modèle ont pu être calculées. Après plusieurs tests de mise au point pour régler la quantité de macrophages/puits nécessaire, la concentration des inhibiteurs et le milieu d'étude, nous avons pu observer les macrophages respirer (Figure 55).

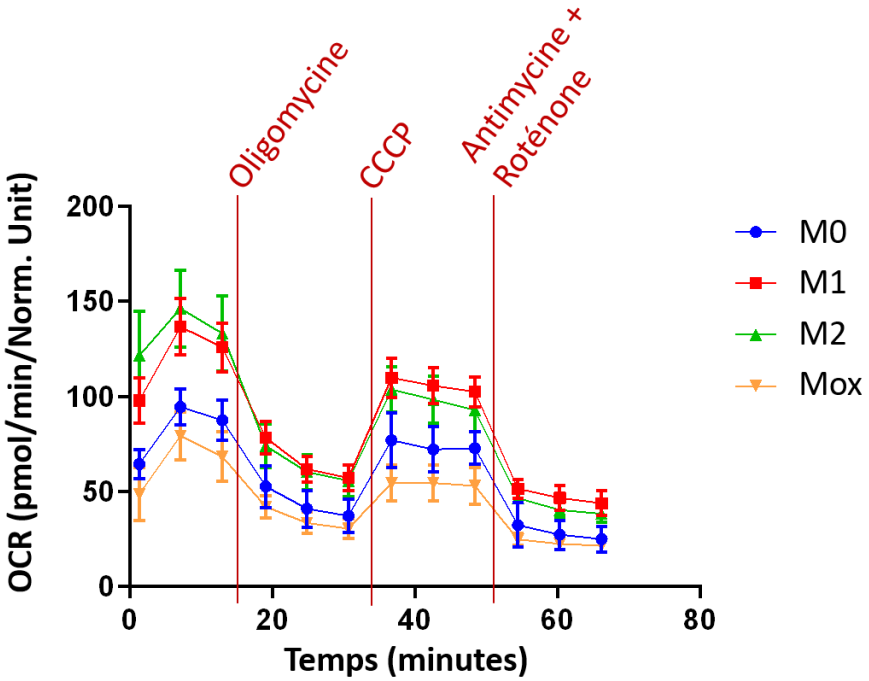


Figure 55 : Courbes représentatives de la mesure de l'OCR (oxygen consumption rate). Les barres rouges correspondent aux injections : la première est l'oligomycine (0,75µM) suivie du CCCP (1,5µM) suivi de l'association antimycine/roténone (0,8µM).

Les points avant l'injection d'oligomycine correspondent à la respiration basale. L'injection d'oligomycine inhibe le complexe IV de la chaîne respiratoire (ATP synthase) en empêchant la consommation d'oxygène. La différence entre les points du début et ceux après l'injection d'oligomycine correspond à la respiration reliée à la production d'ATP. Visuellement, on peut constater que les courbes qui ont la plus forte pente, correspondant à une plus grande différence avant et après l'oligomycine, sont celles des M1 et des M2. Ce sont donc eux qui présentent une plus grande proportion de leur respiration reliée à la production d'ATP. Le CCCP est un découplant de la membrane mitochondriale. Autrement dit, il va dissiper le gradient de protons (force proton-motrice) de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. En réponse, la cellule va faire fonctionner sa chaîne respiratoire au maximum pour essayer de rétablir son gradient de protons. L'injection de CCCP permet donc de mettre en évidence la capacité respiratoire maximale de la cellule. Dans notre cas, nous n'avons jamais réussi à dépasser le seuil initial, même après avoir doublé la concentration de CCCP. Peut-être que cela n'a pas suffi et qu'il faudra augmenter encore la concentration de CCCP. La dernière injection (roténone+antimycine) inhibe complètement la chaîne respiratoire. La roténone inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire et l'antimycine inhibe le complexe III. La cellule ne respirant plus, cela permet d'obtenir un seuil basal correspondant à la consommation d'oxygène non liée à la chaîne respiratoire. Le seuil basal que nous obtenons est encore relativement haut, peut-être que la chaîne respiratoire n'est pas complètement inhibée. Il faudra peut-être augmenter la concentration de roténone+antimycine. Finalement, même si les données liées aux inhibiteurs ne sont pas encore interprétables, nous avons tout de même pu analyser les données de la respiration basale (Figure 56A) ainsi que de l'état glycolytique basal (Figure 56B).

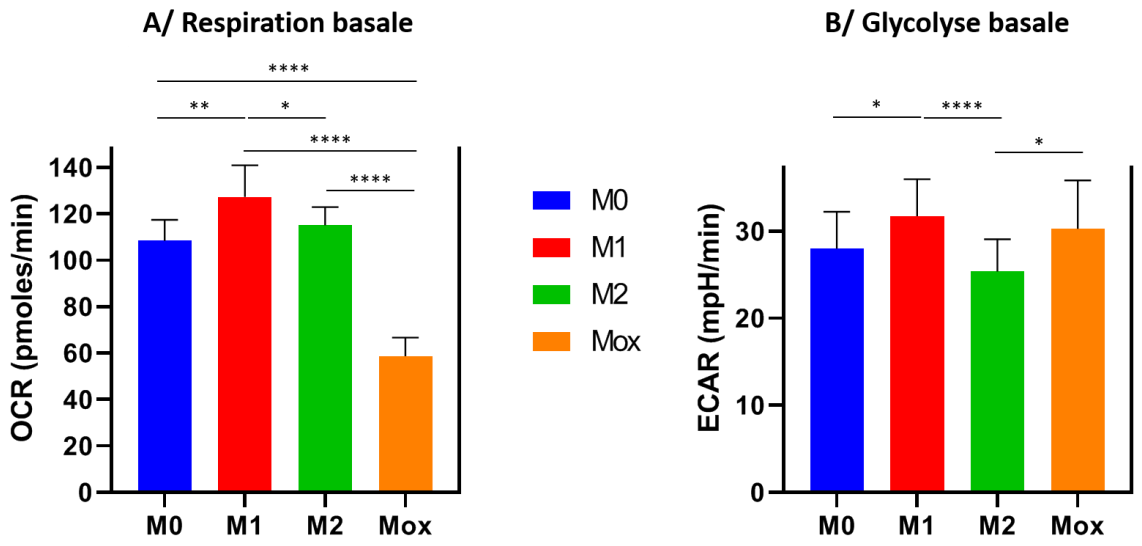


*Figure 56 : Respiration et glycolyse basales. A/ Le taux de consommation d'oxygène (OCR) basal est la consommation d'oxygène avant la première injection, il correspond donc à la respiration basale. B/ Le taux d'acidification extracellulaire (ECAR) basal est, de la même manière, l'acidification du milieu avant la première injection, il équivaut à la glycolyse basale. Le test statistique effectué est un ANOVA avec données regroupées suivi d'un test post-hoc de Tukey : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ****p<0,0001. n=6.*

Les données de respiration basale ont montré que les macrophages M1 respirent autant, voire même plus, que les macrophages M2. Cette différence statistique n'est que de *p**, peut-être que davantage de données supprimeraient la différence statistique. En revanche, la différence de respiration entre les macrophages spumeux (stimulés avec des LDLox) et les autres cellules est très forte (*p*****). Les macrophages spumeux respirent, statistiquement, environ deux fois moins que les M0, M1 et M2. On peut alors supposer que les macrophages spumeux ont, soit un métabolisme peu basé sur la respiration mitochondriale, soit un métabolisme moins intense que les M1/M2 dû à une moins forte demande énergétique, soit une altération fonctionnelle globale diminuant fortement le métabolisme. L'étude de l'état glycolytique des cellules (ECAR) permet de répondre à cette question (Figure 9B). En effet, les macrophages spumeux sont statistiquement légèrement plus glycolytiques que les M2 (p*) et au même niveau que les M1, ce qui veut dire qu'ils font davantage fonctionner leur glycolyse que les M2. Leur métabolisme n'est donc finalement pas moins intense mais davantage basé sur la glycolyse que sur la respiration mitochondriale

Afin de confirmer l'état glycolytique des cellules, nous avons dosé l'ATP total produit par les cellules et déterminé s'il était produit plutôt par la glycolyse ou plutôt par la chaîne respiratoire mitochondriale. Grâce au cocktail d'inhibiteurs (antimycine, roténone, oligomycine) il est possible d'inhiber complètement la mitochondrie et donc de dissocier l'ATP fabriqué par la mitochondrie de l'ATP non mitochondrial (provenant de la glycolyse). Les données récoltées de sept donneurs (quatre expériences distinctes) nous ont permis de mettre en évidence que les macrophages M0 et M1

produisent leur ATP quasiment autant via la mitochondrie que via la glycolyse tandis que l'ATP des M2 provient majoritairement de la mitochondrie (à presque 70%). Les macrophages spumeux (stimulés avec des LDLox), quant à eux, produisent leur ATP principalement via la glycolyse (à presque 75%) (Figure 57).

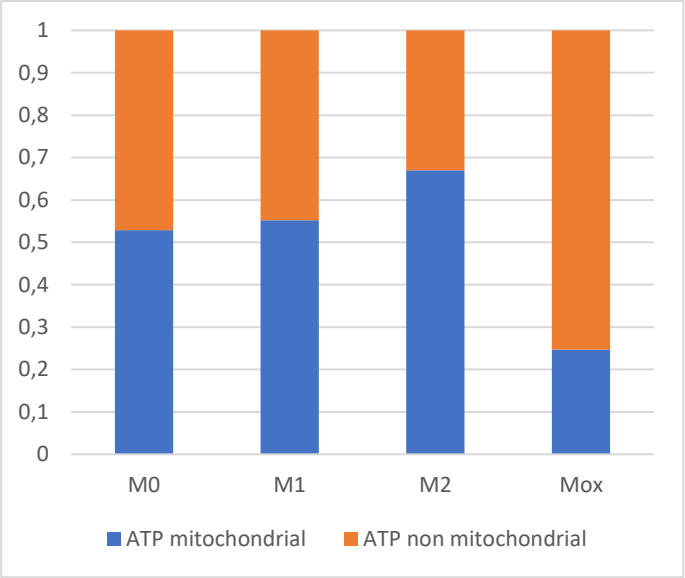


Figure 57 : Proportion d'ATP mitochondrial et non mitochondrial. L'ATP non mitochondrial est obtenu grâce au cocktail d'inhibiteurs bloquant complètement la chaîne respiratoire tandis que l'ATP mitochondrial est obtenu en soustrayant l'ATP non mitochondrial de l'ATP total.

A noter que de nombreuses variations interindividuelles ont été observées (Figure 58). De manière générale, dès que les M0 présentaient une forte proportion d'ATP non mitochondrial, les modèles stimulés à partir du même donneur présentaient également une forte proportion d'ATP non mitochondrial. Autrement dit, l'état basal des M0 (inflammatoire) se répercute sur les conditions de stimulation. Il serait donc très intéressant d'augmenter le nombre de donneurs dans cette étude pour lisser ces variations interindividuelles.

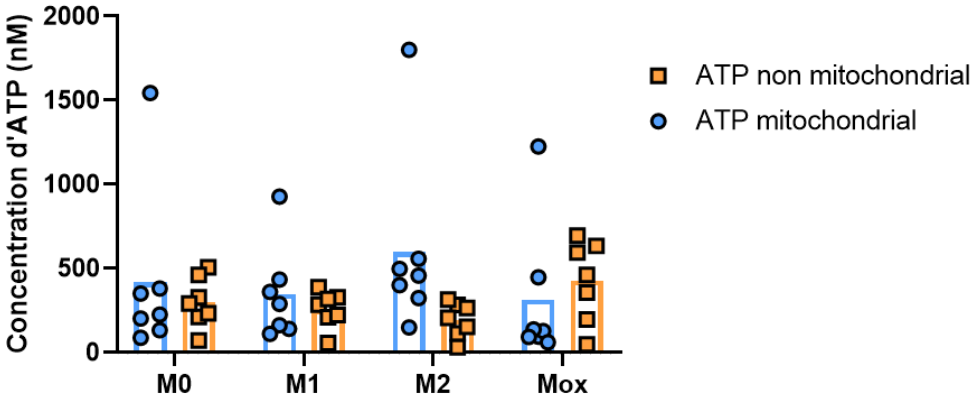


Figure 58 : Variations interindividuelles du dosage de l'ATP. (n=7)

De ces études (respiration cellulaire et production d'ATP), il ressort que les macrophages spumeux (LDLox) ont un métabolisme glycolytique très peu basé sur la respiration mitochondriale. Pour confirmer l'état glycolytique, il aurait été intéressant de pouvoir doser le lactate afin de vérifier que le pyruvate issu de la glycolyse est bien transformé en lactate pour recycler le NADH en NAD et non pas transformé en acétyl-CoA pour alimenter le cycle de Krebs. Une étude récente (Kumar, *et al*. 2020) a montré que la liaison des LDLox sur les macrophages induisait la glycolyse aérobie, en plus de l'inflammation et de la transformation en cellules spumeuses (20). De nombreuses études montrent que la respiration mitochondriale est inhibée dans les M1 (le LPS et l'IFN-γ supprimant l'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire et diminuant fortement celle des complexes III et IV) : cependant ces études sont réalisées sur des cellules murines (21,22). Or il a été démontré récemment que les cellules de souris n'ont pas le même métabolisme que les cellules humaines (23). Finalement, il est probable que les macrophages M1 humains aient toujours une chaîne respiratoire active, alimentée non pas par la β-oxydation des acides gras mais par la glycolyse (22). Quant à la β-oxydation, de nombreuses études ont montré qu'elle permettait de diminuer l'inflammation (24) voire même qu'elle était nécessaire pour l'activation M2 (25). Cependant, ces études ont également été menées chez la souris, et chez l'homme - comme évoqué pour les M1 - les résultats diffèrent. Il a été montré que la β-oxydation n'est pas nécessaire à l'activation M2 (22,26,27), contrairement à la glycolyse (28) et à la présence de glutamine dans le milieu (29).

Cependant, une interrogation persiste : si les macrophages spumeux n'ont pas un métabolisme basé sur la respiration mitochondriale, d'où vient alors cette forte autofluorescence dans le FAD ? Après une analyse de la littérature, il s'est avéré que la contribution du FAD intervenant dans la réaction de la SDH (ou complexe II de la chaîne respiratoire) est négligeable vis-à-vis de l'autofluorescence totale du FAD qui provient à 50% de la lipoamide déshydrogénase (LipDH), à 25% des flavoprotéines responsables du transfert des électrons et à 25% de flavoprotéines non connectées au métabolisme (30,31). De plus, la forte autofluorescence que l'on observe dans le canal du FAD ne proviendrait pas seulement du FAD, mais en grande partie de l'autofluorescence d'agrégats protéiques s'accumulant dans les cellules sénescentes, nommés lipofuscines ou céroïdes (32,33). Les lipofuscines dérivent généralement d'un mélange de protéines et lipides oxydés, de carbohydrates et parfois de métaux, soit environ 2/3 de protéines, 1/3 de lipides et comme métal principal, du fer (32). Les céroïdes sont un type de lipofuscines qui s'accumulent en conditions pathologiques, notamment au niveau des lysosomes (32). Mais il est très difficile de distinguer les lipofuscines des céroïdes, car elles ont des propriétés spectrales extrêmement proches. Les molécules fluorescentes sont plutôt appelées *ceroid-*

like ou *lipofuscin-like*. Le Tableau 10 présente les propriétés spectrales du FAD et des lipofuscine/céroïdes.

Tableau 10 : Comparaison des propriétés spectrales du FAD et des lipofuscines/céroïdes

	Excitation	**Emission**
FAD	365-465nm (pic à 450nm)	500-650nm (pic à 550nm)
Lipofuscine/ Céroïdes	320-480nm (pic à 360nm)	460-630nm (pic à 539nm)

Il a été montré que ce serait le processus de mitophagie déficient qui a lieu dans les cellules sénescentes qui induirait la formation de lipofuscine (34). L'accumulation de ces lipofuscines/céroïdes dans les lysosomes des macrophages a été mise en évidence par une étude récente (35). Les auteurs ont également démontré que des antioxydants de type cystéamine pouvaient inhiber l'oxydation des LDLox dans les lysosomes, empêchant ainsi la formation de ces céroïdes et restaurant la fonction lysosomale. Une autre étude a montré que les LDLox empêchent les cathepsines de fonctionner, or ce sont elles qui permettent la fonction lysosomale (36). On peut alors supposer que c'est l'accumulation de LDLox, cholestérol et acides gras libres dans les macrophages spumeux induisant la déstabilisation de la fonction lysosomale (comme vu dans le chapitre III de l'introduction) qui empêche le processus de mitophagie et entraine la formation de lipofuscine/céroïdes. De plus, le processus de mitophagie déficient est à l'origine de la respiration mitochondriale fortement diminuée dans les macrophages spumeux. Finalement, l'augmentation de fluorescence dans le canal du FAD que l'on observe pour les macrophages spumeux (plus particulièrement pour le modèle physiopathologique LDLox+EC) ne semble pas être due au métabolisme lié à la respiration mitochondriale mais à l'accumulation d'agrégats protéiques nommés lipofuscine/céroïdes.

I. A. 5) Conclusion sur l'étude des macrophages spumeux et leur comparaison avec les modèles M1 et M2

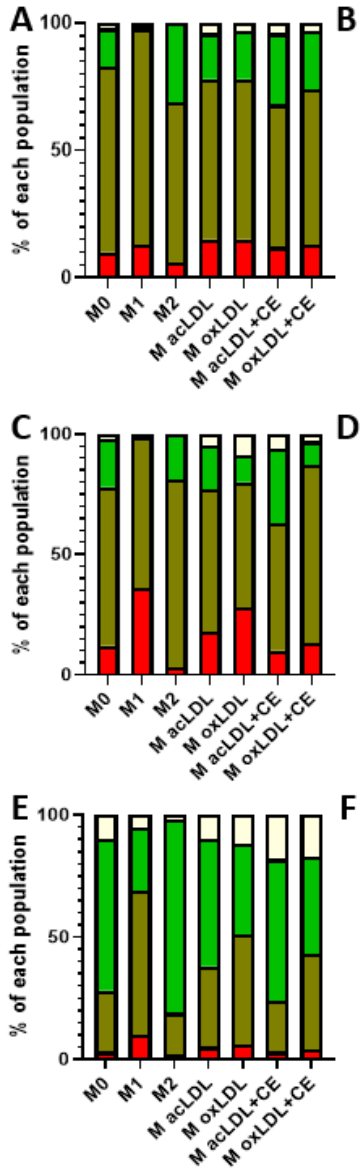
Finalement, cette étude a permis de (1) confirmer le profil inflammatoire de notre modèle M1 (grâce à l'expression des marqueurs CD40 et CD86, et à la production de cytokines IL-6 et TNF-α) et celui anti-inflammatoire du modèle M2 (par l'expression des marqueurs CD206 et CD200R), (2) confirmer l'augmentation de la charge lipidique des macrophages spumeux (coloration au Oil Red), (3) démontrer l'expression à un niveau basal des marqueurs de surface pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans les macrophages spumeux, (4) mettre en évidence un métabolisme propre aux macrophages spumeux permettant une distinction optique des M1, M2 et spumeux, et (5) faire ressortir une tendance montrant que la stimulation avec des LDL acétylées semble induire un profil plus anti-

inflammatoire tandis que la stimulation avec des LDL oxydées semble induire un profil plutôt pro-inflammatoire. La distinction optique des macrophages spumeux par microscopie biphotonique sera utilisée dans le développement d'une sonde endoscopique basée sur de la fibre optique à cœur creux alliant trois modalités, CARS (*Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy*), SHG (*Second Harmonic Generation)* et TPEF, et qui permettra le diagnostic des plaques à risque en détectant, respectivement, les lipides, le collagène et l'autofluorescence NADH/FAD. Nous avons ensuite voulu approfondir la tendance observée lors de la stimulation avec les LDLox ou avec les LDLac mais également l'influence de la présence des extraits carotidiens.

I. B. Comparaison des différents modèles de macrophages spumeux

I. B. 1) Comparaison des marqueurs de surface

Pour aller plus loin que l'analyse de l'expression de chaque marqueur par condition, nous avons tenté de profiter de notre approche multi-marquage pour identifier, pour trois donneurs différents, les différentes sous-populations de macrophages représentées après chaque stimulation. Le marqueur CD40 étant exprimé de manière constitutive sur presque tous les macrophages, nous avons identifié, parmi les cellules CD40+, quatre sous-populations différentes, définies comme « indéterminée » ($CD40^+/CD86^-/CD206^-$), « alternative » ($CD40^+/CD86^-/CD206^+$), « intermédiaire » ($CD40^+/CD86^+/CD206^+$) et « classique » ($CD40^+/CD86^+/CD206^-$) représentées par les codes couleur jaune, vert, kaki et rouge. Le pourcentage de chaque sous-population a été représenté pour chaque donneur sur la Figure 59 (A, C, E). Parmi ces sous-populations, le niveau de coexpression des principaux marqueurs discriminants pour l'état de polarisation, CD40, CD86 et CD206, a été évalué comme faible (*low*), moyen (*med*) ou élevé (*high*) en fonction de leur MFI (Figure 59 tableaux B, D, F pour les donneurs D11, D13 et D14 respectivement). En raison des différences interindividuelles, les résultats seront commentés indépendamment pour chaque donneur avant d'identifier les tendances générales.



	M0 (98,75%)	M1 (99,53%)	M2 (98,82%)	M acLDL (95,40%)	M oxLDL (94,72%)	M acLDL+CE (96,39%)	M oxLDL+CE (96,88%)
	CD40med/CD86-/CD206- 1,80%	CD40high/CD86-/CD206- 1,16%	CD40med/CD86-/CD206- 0,34%	CD40low/CD86-/CD206- 3,51%	CD40low/CD86-/CD206- 3,66%	CD40low/CD86-/CD206- 3,87%	CD40low/CD86-/CD206- 3,14%
	CD40med/CD86-/CD206med 14,75%	CD40high/CD86-/CD206low 0,82%	CD40med/CD86-/CD206high 30,73%	CD40low/CD86-/CD206low 18,34%	CD40low/CD86-/CD206low 18,95%	CD40low/CD86-/CD206low 27,69%	CD40low/CD86-/CD206low 23,27%
	CD40med/CD86med/CD206med 73,14%	CD40high/CD86high/CD206low 85,38%	CD40med/CD86med/CD206high 63,28%	CD40low/CD86low/CD206low 63,33%	CD40low/CD86low/CD206low 62,66%	CD40low/CD86low/CD206low 56,34%	CD40low/CD86low/CD206low 60,75%
	CD40med/CD86med/CD206- 10,31%	CD40high/CD86high/CD206- 12,65%	CD40med/CD86med/CD206- 5,66%	CD40low/CD86low/CD206- 14,82%	CD40low/CD86low/CD206- 14,73%	CD40low/CD86low/CD206- 12,09%	CD40low/CD86low/CD206- 12,85%

	M0 (99,49%)	M1 (99,78%)	M2 (99,73%)	M acLDL (99%)	M oxLDL (98,06%)	M acLDL+CE (97,91%)	M oxLDL+CE (99,02%)
	CD40med/CD86-/CD206- 2,05%	CD40high/CD86-/CD206- 0,63%	CD40med/CD86-/CD206- 0,23%	CD40low/CD86-/CD206- 5,54%	CD40low/CD86-/CD206- 8,78%	CD40low/CD86-/CD206- 5,74%	CD40low/CD86-/CD206- 2,79%
	CD40med/CD86-/CD206med 19,67%	CD40high/CD86-/CD206low 0,27%	CD40med/CD86-/CD206high 19,27%	CD40low/CD86-/CD206med 17,60%	CD40low/CD86-/CD206low 11,10%	CD40low/CD86-/CD206med 30,96%	CD40low/CD86-/CD206med 10,46%
	CD40med/CD86med/CD206med 66,31%	CD40high/CD86high/CD206low 63,51%	CD40med/CD86med/CD206high 77,53%	CD40low/CD86low/CD206med 59,12%	CD40low/CD86low/CD206low 51,61%	CD40low/CD86low/CD206med 53,18%	CD40low/CD86low/CD206med 73,59%
	CD40med/CD86med/CD206- 11,97%	CD40high/CD86high/CD206- 35,59%	CD40med/CD86med/CD206- 2,96%	CD40low/CD86low/CD206- 17,75%	CD40low/CD86low/CD206- 28,51%	CD40low/CD86low/CD206- 10,12%	CD40low/CD86low/CD206- 13,16%

	M0 (77,12%)	M1 (99,31%)	M2 (90,46%)	M acLDL (68,97%)	M oxLDL (62,47%)	M acLDL+CE (40,33%)	M oxLDL+CE (66,85%)
	CD40low/CD86-/CD206- 10,06%	CD40high/CD86-/CD206- 5,25%	CD40med/CD86-/CD206- 2,25%	CD40low/CD86-/CD206- 10,46%	CD40low/CD86-/CD206- 11,71%	CD40low/CD86-/CD206- 18,09%	CD40low/CD86-/CD206- 17,24%
	CD40low/CD86-/CD206low 62,41%	CD40high/CD86-/CD206med 25,64%	CD40med/CD86-/CD206high 79,00%	CD40low/CD86-/CD206low 51,86%	CD40low/CD86-/CD206low 36,76%	CD40low/CD86-/CD206low 58%	CD40low/CD86-/CD206low 39,41%
	CD40low/CD86lhigh/CD206low 24,65%	CD40high/CD86high/CD206med 59,29%	CD40med/CD86med/CD206high 16,97%	CD40low/CD86high/CD206low 32,96%	CD40low/CD86med/CD206low 45,70%	CD40low/CD86high/CD206low 20,49%	CD40low/CD86med/CD206low 39,22%
	CD40low/CD86high/CD206- 2,88%	CD40high/CD86high/CD206- 9,82%	CD40med/CD86med/CD206- 1,77%	CD40low/CD86high/CD206- 4,72%	CD40low/CD86med/CD206- 5,83%	CD40low/CD86high/CD206- 3,42%	CD40low/CD86med/CD206- 4,12%

Figure 59 : Analyse multimarquage

Donneur D13 :

Les macrophages non stimulés (M0) du donneur D13 sont principalement représentés par les macrophages « intermédiaires » et « alternatifs ». Cette population est constituée à 66,31% de macrophages intermédiaires $CD40^{med}/CD86^{med}/CD206^{med}$, à 19,67% de macrophages alternatifs $CD40^{med}/CD86^{-}/CD206^{med}$, et à 11,97 % de macrophages classiques $CD40^{med}/CD86^{med}/CD206^{-}$. La polarisation M1 a été efficace puisqu'après stimulation, seulement deux sous-populations ont pu être observées : 63,51% des cellules sont $CD40^{high}/CD86^{high}/CD206^{low}$ et 35,59% $CD40^{high}/CD86^{high}/CD206^{-}$ avec une nette induction du niveau des marqueurs M1 associée à une réduction du niveau du marqueur M2. La polarisation M2 a également été clairement observée. En effet, les macrophages intermédiaires ($CD40^{med}/CD86^{med}/CD206^{high}$) et les macrophages alternatifs ($CD40^{med}/CD86^{-}/CD206^{high}$) représentant respectivement 77,53% et 19,27% des cellules, montrent une expression plus élevée du marqueur CD206.

L'analyse des macrophages spumeux a montré que les macrophages stimulés avec les LDLac sont plus proches de la stimulation M2 que les macrophages stimulés avec les LDLox. En effet, le niveau de CD206 est plus élevé sur les macrophages alternatifs et intermédiaires après stimulation avec les LDLac ($CD40^{low}/CD86^{-}/CD206^{med}$ et $CD40^{low}/CD86^{low}/CD206^{med}$) qu'après stimulation avec les LDLox ($CD40^{low}/CD86^{-}/CD206^{low}$ et $CD40^{low}/CD86^{low}/CD206^{low}$). De plus, le pourcentage de macrophages classiques ($CD40^{low}/CD86^{low}/CD206^{-}$) est de 17,75% dans les macrophages stimulés avec des LDLac et de 28,1% dans les macrophages stimulés avec des LDLox.

Concernant, l'ajout de l'extrait carotidien (EC), il induit une légère tendance vers une polarisation M2. Pour les macrophages spumeux stimulés avec les LDLox, l'ajout d'EC impacte directement la MFI du CD206 qui passe d'un faible niveau d'expression en présence de LDLox à un niveau d'expression moyen en présence de LDLox+EC sur les macrophages alternatifs et intermédiaires. Il affecte également le pourcentage de macrophages classiques (avec 28,51% de macrophages classiques après stimulation avec LDLox contre 13,16% seulement après stimulation avec LDLox+EC). Quant à la stimulation avec LDLac+EC, elle se caractérise également par une légère diminution du pourcentage de macrophages classiques par rapport à la stimulation avec les LDLac seuls (de 17,75% à 10,12%), ainsi que par une forte augmentation du pourcentage de macrophages alternatifs qui passe de 17,6 % (stimulation avec LDLac) à 30,96% (stimulation avec LDLac+EC).

Donneur D11 :

Les cellules M0 du donneur D11 (proches de celles du donneur D13) sont représentées par 73,14% de macrophages intermédiaires ($CD40^{med}/CD86^{med}/CD206^{med}$), 14,75% de macrophages alternatifs ($CD40^{med}/CD86^{-}/CD206^{med}$) et 10,31% de macrophages classiques ($CD40^{med}/CD86^{med}/CD206^{-}$). Comme dans le D13, la polarisation M1 du D11 induit une augmentation du niveau d'expression du CD40 et du CD86 à la surface cellulaire des macrophages intermédiaires et classiques. Néanmoins, la proportion de macrophages intermédiaires versus classiques dans le D11 après polarisation M1 est plus importante (85,38% vs 12,65%) que celle observée avec D13 (63,51% vs 35,59%). La polarisation M2 de ce donneur a été très efficace car nous avons observé, à l'instar de D13, une augmentation de la MFI du CD206 (passant d'un niveau moyen d'expression à un niveau élevé) sur les macrophages alternatifs mais, chez ce donneur, le pourcentage de cette population (30,73%) est également deux fois plus élevé qu'en condition M0 (14,75%). Toutes ces informations suggèrent que pour ce donneur nous avons obtenu une meilleure polarisation vers M2 et une polarisation moins efficace vers M1.

De manière surprenante, contrairement au D13, aucune augmentation notable du pourcentage de macrophages alternatifs ni augmentation du niveau d'expression du marqueur CD206 sur les macrophages alternatifs et intermédiaires n'ont pu être observées chez le donneur D11 après stimulation avec les LDLac par rapport à la stimulation avec les LDLox.

Néanmoins, encore une fois, l'ajout d'EC se caractérise par une nette augmentation du pourcentage de macrophages alternatifs à la suite de la stimulation avec les LDLac (passant de 18,34% en présence de LDLac contre 27,69% avec LDLac+EC) et par une légère augmentation de ce pourcentage pour la stimulation avec LDLox (non observée dans le D13) (passant de 18,95% avec LDLox à 23,27% avec LDLox+EC).

Donneur D14 :

Il est intéressant de noter que les cellules M0 du donneur D14 semblent déjà orientées vers le phénotype M2 car la population M0 était composée de 62,41% de macrophages alternatifs ($CD40^{low}/CD86^{-}/CD206^{low}$), de 24,65% de macrophages intermédiaires ($CD40^{low}/CD86^{high}/CD206^{low}$) et de seulement 2,88% de macrophages classiques ($CD40^{low}/CD86^{high}/CD206^{-}$). De plus, ces sous-ensembles expriment faiblement le CD40 et le CD206, et fortement le CD86. Cet état basal a rendu la polarisation vers M1 moins efficace. Alors que la polarisation M1 a conduit à des macrophages intermédiaires et classiques pour les donneurs D13 et D11, la polarisation M1 des cellules du D14 a conduit à 25,64% de macrophages alternatifs ($CD40^{high}/CD86^{-}/CD206^{med}$), 59,29% de macrophages intermédiaires ($CD40^{high}/CD86^{high}/CD206^{med}$) (avec une expression moyenne plutôt que faible pour le CD206) et seulement 9,82 % de macrophages classiques ($CD40^{high}/CD86^{high}/CD206^{-}$). En revanche, la

polarisation M2 a abouti à 79% de macrophages alternatifs ($CD40^{med}/CD86^{-}/CD206^{high}$) et à 16,97% de macrophages intermédiaires ($CD40^{med}/CD86^{med}/CD206^{high}$).

Comme dans le D11, le niveau d'intensité du CD206 n'est pas différent entre les modèles stimulés avec les LDLac ou avec les LDLox. Néanmoins, toujours comme dans le D13, le pourcentage de macrophages alternatifs est plus élevé en présence de LDLac qu'en présence de LDLox, lorsque ces LDL sont utilisées seules (51,86% vs 36,76%) mais aussi lorsqu'elles sont utilisées en présence de l'extrait de carotides (58% vs 39,41%) au détriment des populations intermédiaires et classiques qui, elles, diminuent dans les modèles basés sur LDLac par rapport aux modèles basés sur LDLox (32,96% vs 45,70% d'intermédiaires et 4.72% vs 5.83% de classiques sans l'extrait de carotides et 20.49% vs 39.22% d'intermédiaires et 3.42% vs 4.12% de classiques avec l'extrait de carotides).

Enfin, bien que moins évidente que pour les autres donneurs, la présence de l'extrait de carotides entraîne une légère augmentation du pourcentage de macrophages alternatifs passant de 51,86% avec des LDLac à 58% avec des LDLac+CE et passant de 36,76% avec des LDLox à 39,41% avec des LDLox+CE au détriment de la population intermédiaire qui passe de 32.96% à 20.49% et de 45.70 à 39.22% en présence de l'extrait carotidien pour les modèles basés sur LDLac et LDLox respectivement, le pourcentage des populations classiques étant ici peu affecté.

En conclusion, l'identification des sous-ensembles de macrophages à partir des données de cytométrie en flux en multimarquage a montré que les modèles de macrophages spumeux utilisant les LDLac sont plus proches de la stimulation M2 et que ceux obtenus avec les LDLox sont plus proches de la stimulation M1. Cela s'est vu notamment via l'augmentation (LDLac) ou la diminution (LDLox) de l'intensité du CD206 ainsi que via l'augmentation (LDLac) ou la diminution (LDLox) de la proportion de macrophages alternatifs. Quant à l'extrait de carotides, il induit un effet polarisant M2 sur les modèles stimulés avec les LDLac ou LDLox via ce qui a pu être constaté par l'augmentation de la proportion de macrophages alternatifs.

I. B. 2) Dosage des cytokines dans les extraits carotidiens

Pour savoir ce que contenait le pool d'extraits carotidiens que nous avons utilisé pour stimuler certaines conditions, nous avons dosé cinq cytokines, trois pro-inflammatoires (IL-6, TNF-α et IFN-γ) et deux anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10) (Figure 60).

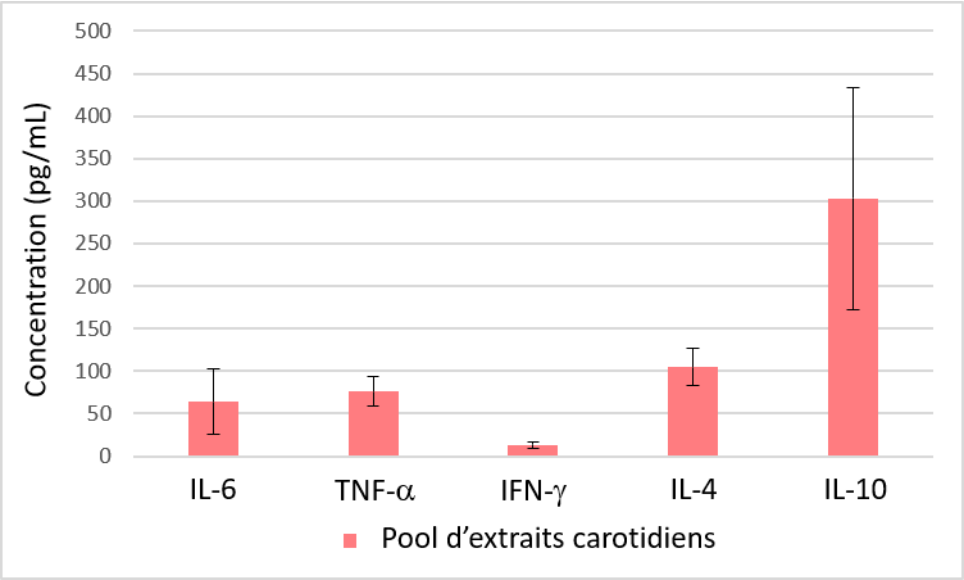


Figure 60 : Dosage des cytokines dans le pool d'extraits carotidiens. Les cytokines IL-6, TNF-α, IFN-γ, IL-4 et IL-10 ont été dosées dans le milieu dans lequel baignent les extraits carotidiens. La présence d'IL-10 est importante, autour de 300pg/mL, tandis que l'IL-6, le TNF-α et l'IL-4 sont entre 50 et 100pg/mL et l'IFN-γ à un niveau basal. Les écart-types correspondent aux différences entre les valeurs obtenues pour les triplicats.

Il ressort de ce dosage que les extraits carotidiens (EC) contiennent principalement de l'IL-10, peu d'IL-6, de TNF-α et d'IL-4 et très peu d'IFN-γ. Cela peut expliquer pourquoi la morphologie des gouttelettes lipidiques des macrophages spumeux obtenus par une stimulation avec LDLox+EC est plus proche de celle observée dans les M2 tandis que celle des macrophages spumeux stimulés avec LDLox sans EC est plus proche de celle observée dans les M1. Cela peut également expliquer la tendance observée dans l'étude du pourcentage des sous-populations de macrophages définies comme alternative, intermédiaire et classique dans l'analyse présentée dans le chapitre précédent, indiquant que l'ajout des EC lors de la stimulation des macrophages induit un profil plus proche de celui des M2.

I. B. 3) Comparaison des différents modèles de macrophages spumeux par rapport à leurs propriétés optiques

D'après la Figure 61A, nous avons pu observer que, d'une manière générale, il n'y a pas de différence concernant l'autofluorescence du NADH entre les macrophages spumeux et les M1. Nous avons observé des différences statistiques différentes avec une valeur *p** entre LDLac et M2, et une valeur *p**** entre LDLox et M2. Ces résultats confirment que les macrophages stimulés avec des LDLox sont plus proches des M1 (ce qui va dans le sens de leur préférence pour la voie glycolytique que nous avons observée grâce au dosage de la production d'ATP liée aux deux voies du métabolisme énergétique) et plus éloignés des M2 concernant l'autofluorescence du NADH. Par ailleurs, nous avons observé moins de NADH dans les modèles LDLox+EC ou LDLac+EC par rapport aux LDLox, même si cette différence n'est pas significative statistiquement parlant entre LDLox+EC et LDLox. Néanmoins, en présence de l'extrait de carotide, il n'y a plus de différence statistique entre nos modèles spumeux et le modèle M2 (en effet, le modèle EC est très proche optiquement parlant du modèle M2, et les modèles LDLox+EC et LDLac+EC sont plus proches du modèle M2 que les modèles LDLox et LDLac).

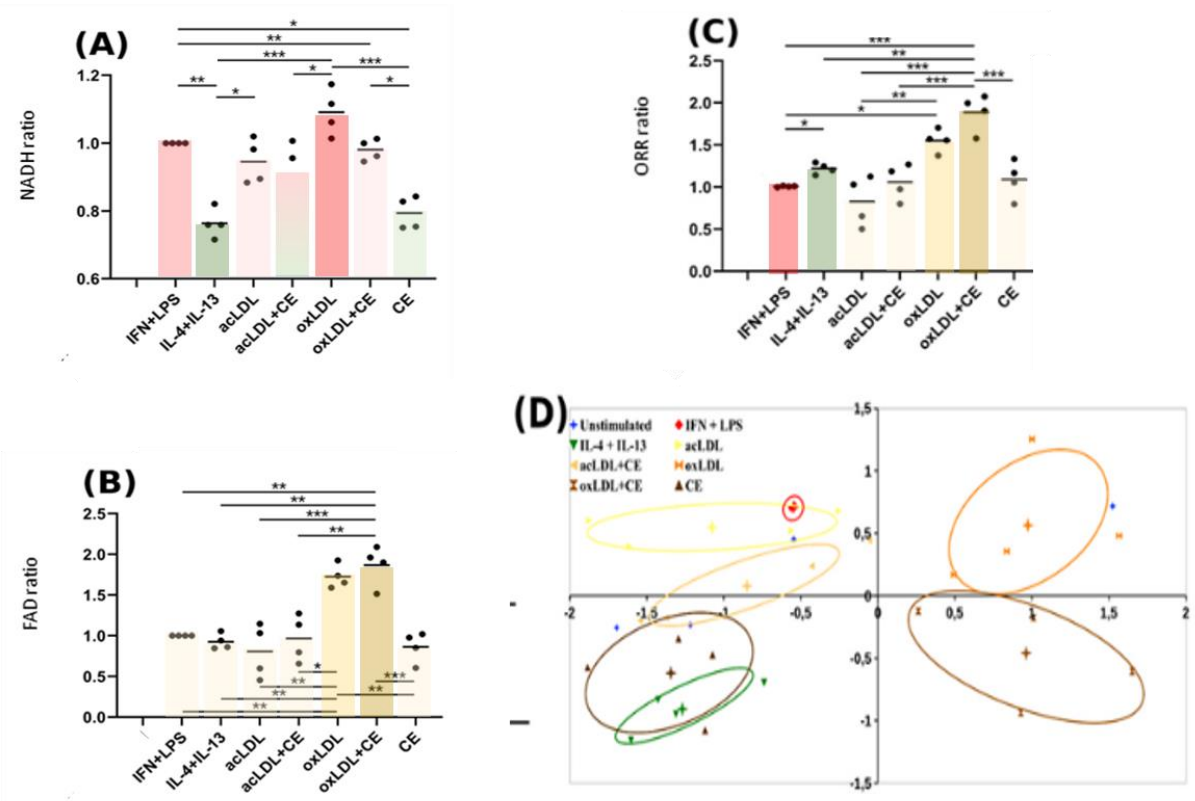


Figure 61 : Représentation de l'autofluorescence du NADH, du FAD, de l'ORR et ACP sur ces données

Dans la Figure 61B, l'autofluorescence observée dans le spectre du FAD est plus forte dans les modèles utilisant les LDLox (LDLox et LDLox+EC) que dans les modèles basés sur l'utilisation de LDLac (avec ou sans EC). Une hypothèse est que les LDLox pourraient induire la production de lipofuscine/céroïdes à l'origine de la fluorescence retrouvée dans le canal du FAD (32,36).

La Figure 61C examinant le ratio redox optique (ORR) a permis de confirmer certaines différences statistiques observées dans les Figures 61A (NADH) et 61B (FAD). Par exemple, les différences statistiques observées pour le FAD entre le modèle LDLox+EC et M1 (*p***) et LDLox+EC et M2 (*p***) (Figure 61B) sont retrouvées dans l'ORR, respectivement *p**** et *p*** (Figure 61C). Cependant, certaines différences statistiques ont été atténuées voire supprimées par l'ORR. La différence statistique entre M1 et M2 en NADH (*p***) (Figure 61A) est retrouvée en ORR, mais plus faiblement (*p**) (Figure 61C). Mais aussi, les différences statistiques entre M1 et LDLox (*p***) et M2 et LDLox (*p***) en FAD (Figure 61B) sont devenues peu ou non significatives en ORR (Figure 61C). Finalement, le modèle LDLox est plus proche de M2 en FAD que le modèle LDLox+EC mais diffère davantage de M2 que LDLox+EC vis-à-vis du NADH. La différence existe mais elle est gommée par le calcul du ratio. Afin de contourner ce problème, nous avons utilisé une analyse en composantes principales des données issues de l'imagerie TPEF du NADH et du FAD de façon à distinguer les différents modèles (Figure 61D). Nous pouvons observer que l'ajout des extraits de carotides dans les modèles LDLox et LDLac rapproche les nuages de points, respectivement LDLox+EC et LDLac+EC, de celui des M2. A noter également, que le nuage de points du modèle stimulé avec les EC seuls est superposé à celui du M2. Les modèles basés sur une stimulation utilisant les LDLox^{+}/$_{-}$EC sont proches et se distinguent des autres modèles en se plaçant dans un quadrant éloignant.

Cette analyse en composantes principales a ensuite été reprise avec l'ensemble des données issues à la fois de l'imagerie TPEF du NADH et du FAD mais aussi des données de cytométrie (Figure 62). Dans cette analyse, il est possible de mieux apprécier la proximité des macrophages stimulés avec des LDLox (en doré) avec le modèle M1 (en bleu), et leur éloignement relatif en présence de l'extrait de carotide (en argent). De la même façon, la population polarisée M2 représentée par le nuage de points rose est plus proche de celui du modèle LDLac (nuage noir) que celui du modèle LDLac+EC (nuage rouge plus épars).

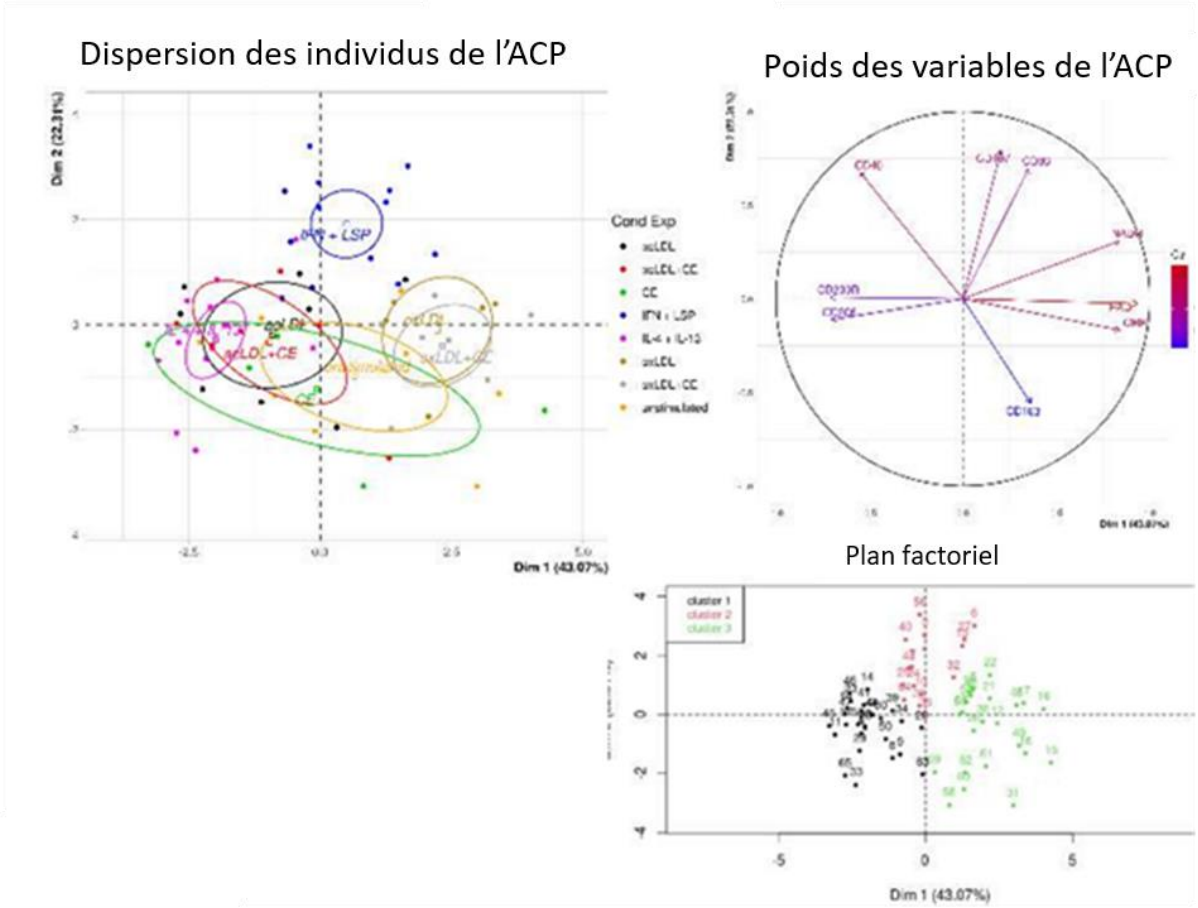


Figure 62 : ACP sur les données de cytométrie et d'imagerie biphotonique (NADH/FAD)

I. B. 4) Conclusion sur les différents modèles de macrophages spumeux

L'analyse approfondie de notre étude de multimarquage par cytométrie en flux a permis de (1) confirmer la tendance observée dans la première partie indiquant que la stimulation avec les LDLox induit un profil plus proche des M1 tandis que la stimulation avec les LDLac induit un profil plus proche des M2, et de (2) faire ressortir que la présence des extraits carotidiens (EC) semble également induire un profil davantage anti-inflammatoire. Ces études ont permis de montrer que la stimulation avec les LDLac induit un profil vraiment distinct de la stimulation avec les LDLox. Or les LDLac ne sont pas physiologiques, ce qui met en avant l'importance d'utiliser des LDLox et pas des LDLac lorsque l'on veut mettre au point un modèle de macrophages spumeux physiopathologique.

II. Sélection d'anticorps par phage-display

L'objectif de cette sélection par phage-display est d'isoler des anticorps ciblant spécifiquement les plaques d'athérome afin de mettre au point des outils de diagnostic et/ou de thérapie. Etant donné que ces outils ont pour but d'être utilisés chez l'Homme, il est plus facile de partir d'une banque de scFvs humains plutôt que devoir les humaniser une fois sélectionnés. C'est pourquoi j'ai utilisé une banque de scFvs humains qui, de plus, avait été injectée dans un modèle de lapin athéromateux afin de réaliser une pré-sélection *in vivo* dans un modèle pathologique. Ce modèle de lapin est connu pour être le modèle animal le plus proche de l'homme dans le développement des plaques d'athérosclérose. Cela permet d'isoler des scFvs qui ont la capacité de se fixer sur des cibles existantes *in vivo*, et représentatives de celles présentes dans la pathologie humaine. Etant donné que les macrophages sont les cellules majoritaires au sein des plaques d'athérome et qu'ils sont susceptibles d'être reprogrammés vers un phénotype athéroprotecteur pour des applications en thérapie, nous avons décidé d'affiner la sélection issue du lapin sur notre modèle de macrophages spumeux. Nous avons choisi de démarrer notre sélection *in vitro* à partir du tour 1 de la sélection *in vivo* afin de ne pas perdre trop de diversité, plus précisément de la fraction correspondant aux phage-scFvs retenus au niveau de l'intima, là où se concentrent les macrophages.

II. A. Biopanning et sélection des phages-scFvs

Les phage-scFvs issus du tour 1 du phage display réalisé *in vivo* dans le lapin ont subi une seconde sélection cette fois *in vitro* sur des macrophages primaires humains dérivés de monocytes sanguins (sélection négative pan-monocytes). La sélection a été faite sur six donneurs afin d'augmenter la diversité des cibles et, ainsi, ne pas écarter des cibles potentielles non ou peu présentes chez un donneur donné. Les plaques de cellules ont été fixées afin que les macrophages soient dans le même état de différenciation et de stimulation (en présence de LDLox et d'extraits de carotide (EC)) pour les trois tours successifs de sélection. Nous avons opté pour trois tours de sélection *in vitro* car il s'agit de sélectionner au fil des tours les clones les plus affins. Le choix du nombre de tour constitue en réalité un compromis : lorsque l'on augmente le nombre de tours de sélection, on favorise la sélection des phage-scFvs les plus affins ce qui s'accompagne forcément d'un appauvrissement de la banque en termes de diversité de phage-scFvs récupérés. Or il se peut que certains de ces phage-scFvs un peu moins affins soient dirigés contre des cibles intéressantes. Il s'agit donc de réaliser un nombre de tours optimum pour sélectionner des clones de bonne affinité spécifiques des macrophages spumeux tout en maintenant une diversité assurant l'identification de cibles pertinentes pour la compréhension

mécanistique de la pathologie (recherche fondamentale) et pour les objectifs de développement d'outils pour le diagnostic et/ou pour la thérapie.

Le Tableau 11 présente le nombre de phage-scFvs obtenus à chaque tour. Lors du premier tour, pour 2.10^{11} phage-scFvs mis au contact des cellules, $2{,}56.10^{5}$ ont été sélectionnés. Lors de l'étape de production, il est possible de générer à nouveau 2.1011 phage-scFvs parmi lesquels on aura amplifié les clones spécifiques. Ainsi, on s'attend à obtenir davantage de phage-scFvs retenus sur notre modèle lors du deuxième tour. De manière intéressante, nous avons pu observer cette progression dans le nombre de phage-scFvs récupérés au fil des tours de sélection suggérant un enrichissement de la banque sélectionnée par phage-display in vitro en clones de phage-scFvs spécifiques de notre modèle.

Tableau 11 : Production de phage-scFvs par tour de sélection

	Tour 1	Tour 2	Tour 3
Concentration de phage-scFvs sélectionnés (CFU/mL)	$2{,}56.10^{5}$	$7{,}43.10^{5}$	$1{,}3.10^{6}$

Il est toutefois important de noter que, lors d'une production de phage-scFvs, très peu de phages vont finalement exprimer le scFv à leur surface (moins de 10%). Il est donc important après cette sélection *in vitro* de cribler les clones de manière individuelle pour leur interaction spécifique avec notre modèle de macrophage spumeux. Pour cela, une partie de la sélection du tour 3 a été étalée et les clones individuels de bactéries ainsi isolés ont été piqués et congelés de manière à obtenir une production de clones individuels. Ceux-ci ont ensuite été testés par ELISA sur des macrophages spumeux préparés à l'avance et fixés. Ce repiquage se fait dans des plaques de 96 puits adaptées à la culture bactérienne, et appelées Masterblocks. Dix Masterblocks ont ainsi été congelés à partir de notre sélection soit environ un millier de clones individuels issus du tour 3 de la sélection *in vitro* par phage display.

II. B. Criblage *in vitro* des phage-scFvs par ELISA

Pour cribler ces clones, nous avons à nouveau dû préparer des macrophages spumeux à partir des MDM humains. Pour des raisons économiques, nous avons criblé à partir de MDM stimulés avec des LDLox sans extraits carotidiens car cela aurait nécessité de trop grandes quantités d'extraits de carotides de patients par rapport à notre stock que l'on souhaitait conserver pour des études mécanistiques.

En dépit de l'utilisation de l'hyperphage pour la production des clones individuels, il s'avère que la plupart des phages produits n'expriment pas de scFv. Il est alors très important de pouvoir évaluer leur fixation aspécifique. Nous avons donc dosé la production de nos phage-scFvs individuels (environ huit clones dosés au hasard par plaque). Ce dosage permettra, lors du test de criblage de comparer les DO des phage-scFvs et d'hyperphage de même concentration afin de déterminer le seuil de spécificité.

Afin d'identifier des phage-scFvs ciblant des marqueurs spécifiques des macrophages spumeux, nous avons testé en parallèle leur interaction sur des macrophages spumeux et sur des macrophages M0 autologues (c'est-à-dire issus du même donneur) adsorbés sur une même plaque ELISA. Par ailleurs, une gamme de concentration d'hyperphages auxiliaires (bornant les variations de concentrations des phage-scFvs produits) a été utilisée en tant que contrôle négatif. Les DO obtenues pour l'interaction de ces contrôles négatifs avec les M0 ou avec des macrophages stimulés avec des LDLox (Mox) ont été moyennées et ces moyennes sont représentées, respectivement, par les barres de seuil violette et rouge (Figure 63, Figure 64), au-dessus desquelles on considère que l'interaction peut être spécifique et non liée à une interaction avec une protéine de surface du bactériophage autre que le fragment scFv). Des contrôles positifs ont également été réalisés via l'utilisation d'anticorps murins anti-marqueurs de surface exprimés sur les macrophages spumeux (à savoir les CD36, CD86 et CD206). De cette manière, il est ainsi possible de tester entre 36 et 38 clones par plaque, ce qui représente environ 30 plaques ELISA pour réaliser ce criblage.

Un exemple de résultats pour un masterblock est donné ci-dessous dans les Figure 63 (Clones A à C) et 64 (Clones D à F). On peut constater que les DO des clones sélectionnés sont relativement faibles mais cela peut être expliqué de deux manières. La première est une densité faible de macrophages ou une faible expression des cibles sur les macrophages. En effet, les DO obtenues en présence des anticorps murins ciblant les molécules CD86 et CD206 sont peu élevées, ce qui est due à une faible densité de macrophages. La deuxième manière est la valence des anticorps testés. Les clones phage-scFvs sont monovalents alors que les anticorps monoclonaux des contrôles positifs sont divalents et présentent donc une meilleure avidité. L'objectif initial était de différencier des clones ciblant préférentiellement les macrophages spumeux. Cependant, les marqueurs de surface des macrophages sont généralement des marqueurs communs entre les différents modèles et c'est leur niveau d'expression qui varie entre les différentes conditions de stimulation. Ainsi, on ne s'attendait pas à trouver des marqueurs qui soient uniquement présents à la surface de macrophages spumeux mais plutôt à des marqueurs surexprimés ou sous-exprimés à la surface de ces cellules par rapport aux M0.

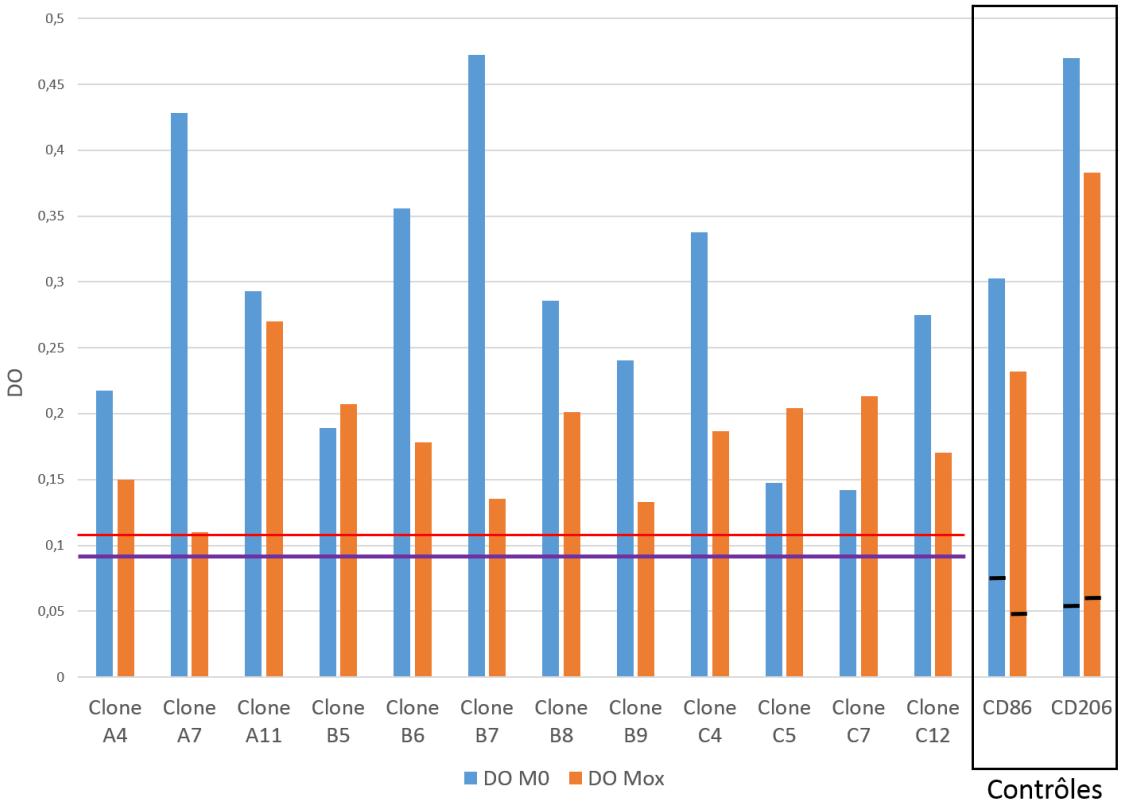


Figure 63 : Représentation en histogramme du criblage par ELISA (exemple de la première moitié d'une plaque). Les DO obtenues pour les clones et les contrôles sont représentées en bleu pour celles sur les M0 et en orange pour celles sur les macrophages spumeux (Mox). Les DO obtenues pour l'hyperphage à la même concentration que les clones sont représentées par les barres horizontales rouge pour Mox et violette pour M0. Les barres noires des contrôles correspondent aux DO de l'anticorps secondaire seul.

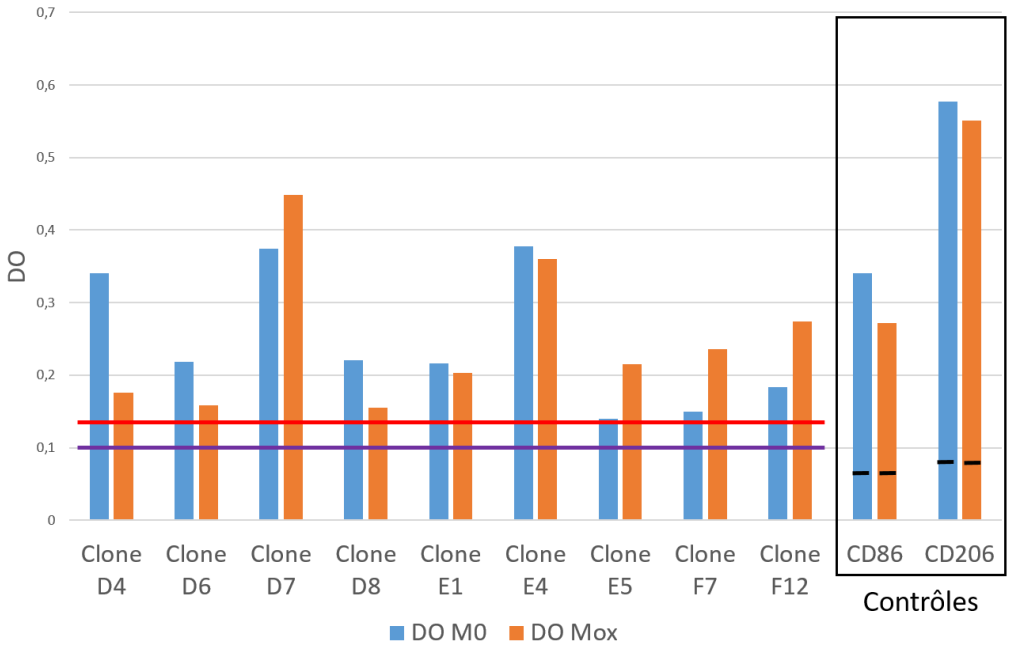


Figure 64 : Représentation en histogramme du criblage par ELISA (exemple de la deuxième moitié d'une plaque). Les DO obtenues pour les clones et les contrôles sont représentées en bleu pour celles sur les M0 et en orange pour celles sur les macrophages spumeux (Mox). Les DO obtenues pour l'hyperphage à la même concentration que les clones sont représentées par les barres horizontales rouge pour Mox et violette pour M0. Les barres noires des contrôles correspondent aux DO de l'anticorps secondaire seul.

De ces figures il ressort que les clones C5 et C7 (Figure 63) et D7, E5, F7 et F12 (Figure 64) interagissent plus fortement avec les Mox qu'avec les M0, ce qui pourrait signifier que leur cible est plus représentée à la surface des Mox. Ce résultat est forcément sous-estimé du fait que, dans le puits contenant les Mox, toutes les cellules ne sont pas forcément des macrophages spumeux (une petite partie de ces cellules a pu rester à un stade M0). Notre expérience nous a également permis de constater que de nombreux macrophages meurent à la suite de leur stimulation en présence de LDLox, tant et si bien qu'une DO légèrement plus faible dans les Mox que dans les M0 peut être intéressante. En revanche, cela valide d'autant plus la différence inverse : une DO plus élevée en présence de Mox signifie clairement que l'on a identifié des candidats intéressants car spécifiquement dirigés contre des macrophages spumeux. Par ailleurs, du fait de l'hétérogénéité des macrophages dans le modèle de sélection, il est tout à fait possible de sélectionner des anticorps ciblant des marqueurs de macrophages non spumeux, mais encore une fois pour ces marqueurs présents à la surface des macrophages, il s'agit généralement de marqueurs communs dont seule l'expression varie d'une condition à l'autre. Un autre point important est que la disparition (ou plutôt la diminution d'expression) d'un marqueur lorsque le macrophage devient spumeux peut également être intéressante pour le diagnostic. En effet, on peut détecter une zone correspondant à des macrophages spumeux par rapport à l'absence d'un signal qui serait présent dans des zones saines. Bien entendu, il est nécessaire de valider les premiers clones identifiés lors de ce premier criblage en les testant à nouveau en ELISA (pour confirmer leur interaction spécifique) puis en cytométrie de flux en présence de LDLox couplés au fluorochrome Dil (LDLox-Dil) ce qui permettra de vérifier s'ils reconnaissent bien la population spumeuse.

Sur les 1000 clones testés, environ 47 clones reconnaissent plus fortement les Mox que les M0 ce qui correspond à des clones dirigés contre une cible spécifiquement exprimée sur les macrophages spumeux ou réprimée sur les M0. Environ 65 reconnaissent davantage les M0 que les Mox, correspondant aux clones dirigés contre une cible spécifiquement exprimée sur les M0 et réprimée sur les macrophages spumeux. Nous avons également conservé 48 clones qui présentent une forte DO pour les deux modèles. Ils seront également testés ultérieurement car potentiellement d'intérêt étant donné leur forte affinité pour des macrophages. Après validation en ELISA et en cytométrie, les candidats sélectionnés seront testés pour leur interaction avec le modèle LDLox+EC.

II. C. Conclusion sur la sélection par phage-display

Cette sélection par phage-display nous a permis d'isoler un millier de clones potentiellement spécifiques des macrophages spumeux des plaques d'athérome. Le test ELISA réalisé pour cribler ces clones a permis de sélectionner environ 150 clones dont la spécificité sera ultérieurement identifiée. A la suite des différents tests de validation, les clones candidats seront séquencés. Il sera alors possible de reformater les scFv en anticorps entier ou en Fab pour qu'ils puissent être utilisés pour mettre au point les outils diagnostiques ou thérapeutiques.

Références :

1. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. Immunity. 2018 Oct 16;49(4):595–613.

2. Chinetti-Gbaguidi G, Baron M, Bouhlel MA, Vanhoutte J, Copin C, Sebti Y, et al. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARγ and LXRα pathways. Circ Res. 2011 Apr 15;108(8):985–95.

3. Mendoza-Coronel E, Ortega E. Macrophage Polarization Modulates FcγR- and CD13-Mediated Phagocytosis and Reactive Oxygen Species Production, Independently of Receptor Membrane Expression. Front Immunol. 2017;8:303.

4. Cho KY, Miyoshi H, Kuroda S, Yasuda H, Kamiyama K, Nakagawara J, et al. The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc. 2013 Oct;22(7):910–8.

5. Lee CW, Hwang I, Park C-S, Lee H, Park D-W, Kang S-J, et al. Macrophage heterogeneity of culprit coronary plaques in patients with acute myocardial infarction or stable angina. Am J Clin Pathol. 2013 Mar;139(3):317–22.

6. Peled M, Fisher EA. Dynamic Aspects of Macrophage Polarization during Atherosclerosis Progression and Regression. Front Immunol. 2014 Nov 12;5.

7. Bellón T, Martínez V, Lucendo B, del Peso G, Castro MJ, Aroeira LS, et al. Alternative activation of macrophages in human peritoneum: implications for peritoneal fibrosis. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 2011 Sep;26(9):2995–3005.

8. Stöger JL, Gijbels MJJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EAL, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. Atherosclerosis. 2012 Dec;225(2):461–8.

9. Vogel DYS, Glim JE, Stavenuiter AWD, Breur M, Heijnen P, Amor S, et al. Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. Immunobiology. 2014 Sep 1;219(9):695–703.

10. Colin S, Fanchon M, Belloy L, Bochem AE, Copin C, Derudas B, et al. HDL does not influence the polarization of human monocytes toward an alternative phenotype. Int J Cardiol. 2014 Mar 1;172(1):179–84.

11. Molawi K, Wolf Y, Kandalla PK, Favret J, Hagemeyer N, Frenzel K, et al. Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. J Exp Med. 2014 Oct 20;211(11):2151–8.

12. Bekkering S, van den Munckhof I, Nielen T, Lamfers E, Dinarello C, Rutten J, et al. Innate immune cell activation and epigenetic remodeling in symptomatic and asymptomatic atherosclerosis in humans in vivo. Atherosclerosis. 2016 Nov 1;254:228–36.

13. Christ A, Günther P, Lauterbach MAR, Duewell P, Biswas D, Pelka K, et al. Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. Cell. 2018 Jan 11;172(1–2):162-175.e14.

14. Bekkering S, Quintin J, Joosten LAB, van der Meer JWM, Netea MG, Riksen NP. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014 Aug;34(8):1731–8.

15. Georgakoudi I, Quinn KP. Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state. Annu Rev Biomed Eng. 2012;14:351–67.

16. Mayevsky A, Rogatsky GG. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. Am J Physiol-Cell Physiol. 2007 Feb 1;292(2):C615–40.

17. Quinn KP, Sridharan GV, Hayden RS, Kaplan DL, Lee K, Georgakoudi I. Quantitative metabolic imaging using endogenous fluorescence to detect stem cell differentiation. Sci Rep. 2013 Dec 5;3:3432.

18. Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders—past, present and future. Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg. 2004 Dec 6;1659(2):115–20.

19. Shemiakova T, Ivanova E, Grechko AV, Gerasimova EV, Sobenin IA, Orekhov AN. Mitochondrial Dysfunction and DNA Damage in the Context of Pathogenesis of Atherosclerosis. Biomedicines. 2020 Jun 18;8(6).

20. Kumar A, Gupta P, Rana M, Chandra T, Dikshit M, Barthwal MK. Role of pyruvate kinase M2 in oxidized LDL-induced macrophage foam cell formation and inflammation. J Lipid Res. 2020;61(3):351–64.

21. Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jun 23;95(13):7631–6.

22. Van den Bossche J, Baardman J, Otto NA, van der Velden S, Neele AE, van den Berg SM, et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. Cell Rep. 2016 11;17(3):684–96.

23. Vijayan V, Pradhan P, Braud L, Fuchs HR, Gueler F, Motterlini R, et al. Human and murine macrophages exhibit differential metabolic responses to lipopolysaccharide - A divergent role for glycolysis. Redox Biol. 2019 Apr 1;22:101147.

24. Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, Zhang L, Smith KL, Morel CR, et al. Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. Cell Metab. 2006 Jul;4(1):13–24.

25. Huang SC-C, Everts B, Ivanova Y, O'Sullivan D, Nascimento M, Smith AM, et al. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. Nat Immunol. 2014 Sep;15(9):846–55.

26. Nomura M, Liu J, Rovira II, Gonzalez-Hurtado E, Lee J, Wolfgang MJ, et al. Fatty acid oxidation in macrophage polarization. Nat Immunol. 2016 Mar;17(3):216–7.

27. Namgaladze D, Brüne B. Fatty acid oxidation is dispensable for human macrophage IL-4-induced polarization. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids. 2014 Sep 1;1841(9):1329–35.

28. Tan Z, Xie N, Cui H, Moellering DR, Abraham E, Thannickal VJ, et al. Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Participates in Macrophage Polarization via Regulating Glucose Metabolism. J Immunol. 2015 Jun 15;194(12):6082–9.

29. Jha AK, Huang SC-C, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. Immunity. 2015 Mar 17;42(3):419–30.

30. Kunz WS, Kunz W. Contribution of different enzymes to flavoprotein fluorescence of isolated rat liver mitochondria. Biochim Biophys Acta. 1985 Sep 6;841(3):237–46.

31. Kolenc OI, Quinn KP. Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD(P)H and FAD. Antioxid Redox Signal. 2019 Feb 20;30(6):875–89.

32. Seehafer SS, Pearce DA. You say lipofuscin, we say ceroid: Defining autofluorescent storage material. Neurobiol Aging. 2006 Apr 1;27(4):576–88.

33. Rice WL, Kaplan DL, Georgakoudi I. Two-Photon Microscopy for Non-Invasive, Quantitative Monitoring of Stem Cell Differentiation. PLOS ONE. 2010 Apr 16;5(4):e10075.

34. König J, Ott C, Hugo M, Jung T, Bulteau A-L, Grune T, et al. Mitochondrial contribution to lipofuscin formation. Redox Biol. 2017 Jan 25;11:673–81.

35. Wen Y, Ahmad F, Mohri Z, Weinberg PD, Leake DS. Cysteamine inhibits lysosomal oxidation of low density lipoprotein in human macrophages and reduces atherosclerosis in mice. Atherosclerosis. 2019;291:9–18.

36. Weiss-Sadan T, Maimoun D, Oelschlagel D, Kaschani F, Misiak D, Gaikwad H, et al. Cathepsins Drive Anti-Inflammatory Activity by Regulating Autophagy and Mitochondrial Dynamics in Macrophage Foam Cells. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2019;53(3):550–72.

Conclusions & Perspectives

Etude de l'athérogenèse via la mise au point et la caractérisation d'un modèle physiopathologique de macrophages spumeux

Les plaques d'athérome existent chez l'Homme depuis des milliers d'années. Leur description scientifique n'a vraiment débuté qu'à partir du 18ème siècle et n'a, depuis, cessé d'être approfondie. Il est clair, aujourd'hui, que cette pathologie complexe fait intervenir une multitude de cellules immunes et non immunes ainsi que de nombreux facteurs moléculaires. L'accumulation de lipides oxydés au sein de la paroi artérielle induit son inflammation, recrutant ainsi de nombreuses cellules immunitaires dont le rôle est d'éliminer ces lipides oxydés puis de diminuer l'inflammation et de réparer les dégâts tissulaires. Lorsque ces mécanismes dysfonctionnent, cela aboutit à la formation des plaques d'athérome. Tout d'abord, les cellules responsables de l'élimination des lipides oxydés (macrophages spumeux) sont peu à peu submergées par l'afflux de lipides et, incapables de tout éliminer, entrent en apoptose. Les macrophages immunorégulateurs se retrouvent alors eux-mêmes débordés par la quantité de macrophages apoptotiques à éliminer et incapables de réaliser leur efferocytose. Les cellules mortes s'accumulent et forment le cœur lipidique nécrotique. L'inflammation excessive ainsi que l'accumulation de molécules dégradant la chape fibreuse (paroi de la plaque l'isolant de la circulation sanguine) sont des facteurs provoquant la rupture de cette chape fibreuse et les conséquences catastrophiques qui en découlent telles que les AVC ou les infarctus du myocarde. Les macrophages jouent un rôle central dans l'athérogenèse. Dans les plaques progressives, les monocytes recrutés se différencient en macrophages inflammatoires (M1) au détriment des macrophages résidents (plutôt de profil anti-inflammatoire). Les monocytes et macrophages présents au sein de la plaque se transforment en macrophages spumeux après phagocytose des LDL oxydées (LDLox). Alors que les macrophages pro-inflammatoires sont clairement pro-athérogènes et les macrophages anti-inflammatoires en faveur de la régression des plaques, le profil des macrophages spumeux fait encore débat. S'ils étaient tout d'abord considérés comme pro-inflammatoires et donc pro-athérogènes, des études récentes remettent cette affirmation en question. En effet, plusieurs études de séquençage ARN sur cellules uniques ont distingué les macrophages spumeux, des macrophages inflammatoires et des macrophages résidents (1–7). Le rôle des macrophages spumeux semble plutôt différer selon le stade de progression des plaques. En effet, leur rôle anti-athérogène essentiel, à savoir l'efflux de cholestérol, est progressivement inhibé au cours de l'athérogenèse. La restauration de l'efflux de cholestérol comme approche thérapeutique de l'athérosclérose était déjà envisagée mais nécessite une caractérisation plus poussée des modèles de macrophages spumeux. Dans cet objectif, j'ai développé un modèle de macrophages spumeux physiopathologique que j'ai caractérisé du point de vue phénotypique, via l'étude des marqueurs de surface inflammatoires et immunorégulateurs, et

métabolique via l'étude des propriétés optiques liées au métabolisme énergétique et via l'étude de la respiration cellulaire.

La mise en parallèle de nos études phénotypique et métabolique nous a permis de mettre en évidence que les macrophages spumeux expriment les marqueurs de surface inflammatoires et immunorégulateurs à un niveau basal, et qu'ils ont un métabolisme glycolytique. De plus, ils sécrètent peu de cytokines pro-inflammatoires contrairement aux macrophages M1. Notre modèle de macrophages spumeux n'est finalement ni M1 ni M2, ce qui est d'ailleurs en accord avec les publications récentes citées ci-dessus (1–7). De plus, les propriétés optiques des macrophages spumeux semblent indiquer qu'ils possèdent de nombreuses molécules autofluorescentes (céroïdes, lipofuscine) impliquées dans la dégradation lysosomale à l'origine de l'arrêt de la respiration cellulaire et de l'efflux de cholestérol, et de l'induction de l'apoptose. Le modèle de macrophage spumeux que nous avons mis en place correspond donc à des macrophages en voie d'entrer en apoptose. Or, si l'on considère que l'inhibition du processus d'efflux du cholestérol au cours de l'athérogenèse dans les macrophages spumeux a lieu progressivement, les macrophages spumeux ne sont alors pas homogènes. Ils évoluent au cours du temps, avec probablement des phénotypes et des métabolismes différents. Les macrophages spumeux au début de leur vie de macrophages spumeux (« jeunes ») sont capables de réaliser l'efflux de cholestérol, ils sont donc en faveur de la régression des plaques. Quant à leur métabolisme énergétique et leur profil, on peut supposer qu'ils ont plutôt un profil M2 car les M1 ne réalisent pas l'efflux de cholestérol. Par la suite, au fur et à mesure qu'ils internalisent des lipides oxydés, ils n'arrivent plus à bien les gérer et les éliminer, ce qui va induire progressivement la dysfonction lysosomale, l'inflammation et leur entrée en apoptose. Les macrophages en fin de vie, (« vieux ») seraient donc plus proches des M1, car inflammatoires et incapables de réaliser l'efflux de cholestérol. Il apparait donc nécessaire d'étudier ces macrophages spumeux par rapport au temps de contact avec les lipides oxydés. Autrement dit, il faudrait étudier les macrophages spumeux *in vitro*, à différents temps d'incubation après la mise en présence de leurs stimuli. Cela permettrait sûrement d'isoler un marqueur permettant de différencier les macrophages spumeux encore capables de réaliser l'efflux de cholestérol (jeunes) des macrophages proches de l'apoptose (vieux). Ce marqueur pourrait ensuite être appliqué pour les études *in vivo* par exemple de séquençage ARN sur cellules uniques (pour lesquelles il n'est, bien évidemment, pas possible d'isoler les macrophages spumeux en fonction de leur état de développement). Dans cette optique, la distinction optique des macrophages spumeux que nous avons obtenue apparait comme une bonne piste. Elle permettrait ainsi de distinguer les macrophages spumeux en voie d'apoptose. Bien évidemment, des études *in vitro* supplémentaires sont nécessaires afin de vérifier que les macrophages spumeux « jeunes » ne possèdent pas d'autofluorescence dans le canal du FAD/céroïdes. Pour cela, les perspectives à court

terme de notre modèle consistent à observer optiquement les macrophages spumeux à différents temps d'incubation après la mise en présence des LDLox^{+}/$^{-}$EC. Il faudra également vérifier la présence des céroïdes/lipofuscine, pour cela nous continuerons les expériences de colocalisation de la fluorescence du canal FAD avec un marquage des lysosomes en comparant des incubations de LDLox à différentes concentrations, pour vérifier que ce sont bien les LDLox qui sont à l'origine de la fluorescence dans le canal du FAD (et donc de la formation des céroïdes/lipofuscine).

Recherches sur de nouvelles stratégies diagnostiques et/ou thérapeutiques

Malgré l'évolution des connaissances sur l'athérogenèse et les biomarqueurs à l'origine de la rupture des plaques, les méthodes de diagnostic actuelles se basent toujours uniquement sur le rétrécissement de la lumière du vaisseau. Il n'y a actuellement aucun moyen de diagnostic permettant de distinguer les plaques à risque de rupture des plaques stables. Les traitements tels que les statines, permettant de réduire le taux de cholestérol dans le sang, sont efficaces mais ne permettent pas pour autant une régression complète des plaques. C'est pourquoi le développement d'outils de diagnostic et de thérapie des plaques d'athérome basé sur des biomarqueurs est en plein développement. Dans cette optique, nous avons opté pour deux types de méthode diagnostique et/ou thérapeutique, une semi-invasive basée sur l'utilisation d'une sonde permettant d'observer l'activité métabolique des cellules, et une méthode non invasive basée sur le ciblage des plaques par les anticorps thérapeutiques.

En plus d'être un outil d'étude des macrophages spumeux, la distinction optique via l'autofluorescence du NADH et du FAD pourra être applicable en tant qu'outil de diagnostic. L'objectif est de développer une sonde cathéter basée sur l'observation de trois modalités : l'imagerie de la seconde harmonique du collagène (SHG), la diffusion RAMAN et l'autofluorescence du NADH et du FAD. L'observation du collagène permet de voir l'épaisseur de la chape fibreuse afin de déterminer si elle est à risque de rupture. Les lipides sont détectés grâce à la diffusion RAMAN afin de visualiser la charge lipidique de la plaque. L'autofluorescence NADH/FAD permettra de déterminer le profil général des cellules au sein de la plaque. Cette sonde pourrait être utilisée en seconde intention, chez des patients où des plaques ont déjà été diagnostiquées, afin d'observer si elles sont à risque de rupture. Cela aidera à déterminer la conduite thérapeutique à tenir. L'opération chirurgicale d'endartériectomie étant une opération à risque, un outil diagnostic permettant déterminer le bien-fondé de cette opération serait bienvenue. Cette application à long terme nécessite auparavant des études approfondies des propriétés optiques que nous avons mises en évidence. A court terme, il faudrait donc vérifier la faisabilité de l'observation

de cette autofluorescence *in vivo*. En effet, des questions restent en suspens, notamment concernant l'importance de la fluorescence des cellules adjacentes.

La seconde méthode de diagnostic/thérapie est basée sur l'utilisation d'anticorps thérapeutiques ciblant des biomarqueurs spécifiques des plaques d'athérome. C'est pour cela que nous avons sélectionné par phage-display des anticorps humains ciblant les macrophages spumeux « vieux », caractéristiques des plaques d'athérome à risque de rupture. Nous avons présélectionné environ 150 clones de phage-scFvs. A court terme, il faudra donc vérifier à nouveau leur spécificité via des tests ELISA, sur macrophages spumeux. Par la suite il sera envisagé de vérifier la fixation de ces clones par IHC sur des coupes de biopsies carotidiennes humaines. En outre, ces anticorps pourraient également être utiles à la thérapie. Par exemple, certains anticorps sélectionnés pourraient s'avérer induire des effets sur les macrophages, comme par exemple rétablir l'efflux de cholestérol ou induire une repolarisation d'un profil M1 vers un profil M2. La repolarisation est une approche déjà développée, notamment en cancérologie pour induire un profil M1 à partir de macrophages M2 (8,9). Dans le contexte de l'athérosclérose, l'avantage de repolariser vers M2 permettrait de rétablir la capacité d'efferocytose et probablement aussi l'efflux de cholestérol, les deux processus étant liés à un état de vulnérabilité des plaques (10,11). D'après certaines études, la repolarisation M1 vers M2 est théoriquement plus compliquée à mettre en place. Il a été montré que chez des personnes obèses, les monocytes sanguins n'arrivent plus à se différencier en M2 (12). Cela serait dû au fait que les personnes obèses possèdent davantage de cytokines pro-inflammatoires dans le sang ce qui rendrait les monocytes déjà inflammatoires et réfractaires à une différenciation en M2 (13). Cela se confirme dans une étude sur les macrophages, où il a été montré que les macrophages inflammatoires ne deviennent pas immunorégulateurs après stimulation avec de l'IL-4 (14). Cependant, ces études portent sur des modèles extrêmes de stimulation qui sont probablement atténués *in vivo*. La repolarisation *in vivo* pourrait donc être dans le domaine du possible. Par ailleurs, des études ont montré que l'inhibition de certaines cibles sur les macrophages rendait possible la repolarisation vers M2. Dans l'étude de Van den Bossche, les auteurs ont montré que l'inhibition de l'enzyme iNOS permettait d'augmenter la capacité respiratoire des M1 repolarisés vers M2 (14). Une autre étude a montré qu'un agoniste du LXRα permettait de convertir les macrophages M1 en M2, réduisant en même temps leur charge en cholestérol (grâce à la restauration de l'efflux de cholestérol) (15). Une récente étude a montré que l'injection de la molécule « Baicalin » après une atteinte du myocarde améliorait la réparation cardiaque et diminuait l'inflammation via le changement de phénotype des macrophages de M1 vers M2 (16). Ces études montrent que la repolarisation est possible, et mettent en avant la possibilité que nous avons de sélectionner un anticorps repolarisant. Un test de criblage des anticorps vis-à-vis de leur effet repolarisant est en cours de développement. Il fonctionne sur la

détection de l'autofluorescence NADH/FAD dans les macrophages avant et après le dépôt des anticorps testés. Si l'anticorps induit une baisse du NADH cela pourrait signifier qu'il vient d'induire la repolarisation vers M2. Ce premier test de criblage permet de sélectionner des anticorps dont le potentiel de repolarisation sera ensuite validé par d'autres études, comme par exemple des études de phénotypage par cytométrie en flux pour observer les variations des marqueurs de surface. Les anticorps sélectionnés pour leur ciblage spécifique et, dans certains cas, pour leur effet repolarisant seront séquencés afin de vérifier la conformité de leur séquence. Les perspectives à plus long termes sont de reformater les anticorps sélectionnés en scFv-Fc en vue de les coupler à des nanoparticules magnétiques ou fluorescentes pour le diagnostic mais également à des drogues anti-inflammatoires. Les drogues anti-inflammatoires pourraient s'avérer nécessaires en complément des anticorps potentiellement repolarisants. En effet, si on injecte un anticorps thérapeutique qui repolarise les macrophages vers M2 mais que l'environnement hyper inflammatoire les fait immédiatement réverser vers un profil M1, le traitement ne sera pas efficace. Il faut donc en parallèle diminuer l'environnement inflammatoire. Enfin, il faut garder à l'esprit que les anticorps humains ne sont pas complètement dépourvus d'immunogénicité. En effet, même s'ils sont très proches des anticorps de l'hôte ils n'en restent pas moins des éléments étrangers qui peuvent être reconnus et éliminés par les cellules de l'hôte. Comme tout anticorps humain thérapeutique, des tests de cytotoxicité et d'immunogénicité seront à mettre en œuvre.

Finalement, le développement de ce modèle de macrophages spumeux physiopathologiques a permis de mettre en évidence que les macrophages spumeux ont un phénotype et un métabolisme qui leur sont propres (ni M1 ni M2) et qu'il n'y a pas un seul type de macrophages spumeux mais un continuum en fonction de leur « âge ». Par conséquent, cette étude se place dans le contexte de la compréhension de l'apparition des macrophages spumeux et leur évolution, et de l'identification d'un biomarqueur spécifique des macrophages spumeux apoptotiques. De plus, la sélection d'anticorps spécifiques pourrait aider à de nouvelles immunothérapies pour les maladies cardiovasculaires, au-delà de la gestion traditionnelle des facteurs de risque et de l'utilisation de médicaments hypolipidémiants standards.

Références :

1. Cochain Clément, Vafadarnejad Ehsan, Arampatzi Panagiota, Pelisek Jaroslav, Winkels Holger, Ley Klaus, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis. Circ Res. 2018 Jun 8;122(12):1661–74.

2. Fernandez DM, Rahman AH, Fernandez N, Chudnovskiy A, Amir ED, Amadori L, et al. Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques. Nat Med. 2019 Oct;25(10):1576–88.

3. Kim K, Shim D, Lee JS, Zaitsev K, Williams JW, Kim K-W, et al. Transcriptome Analysis Reveals Non-Foamy Rather than Foamy Plaque Macrophages Are Pro-Inflammatory in Atherosclerotic Murine Models. Circ Res. 2018 Oct 26;123(10):1127–42.

4. Lin J-D, Nishi H, Poles J, Niu X, Mccauley C, Rahman K, et al. Single-cell analysis of fate-mapped macrophages reveals heterogeneity, including stem-like properties, during atherosclerosis progression and regression. JCI Insight. 4(4).

5. Willemsen L, de Winther MP. Macrophage subsets in atherosclerosis as defined by single-cell technologies. J Pathol. 2020 Jan 31;

6. Winkels H, Ehinger E, Vassallo M, Buscher K, Dinh H, Kobiyama K, et al. Atlas of the immune cell repertoire in mouse atherosclerosis defined by single-cell RNA-sequencing and mass cytometry. Circ Res. 2018 Jun 8;122(12):1675–88.

7. Zernecke A, Winkels H, Cochain C, Williams JW, Wolf D, Soehnlein O, et al. Meta-Analysis of Leukocyte Diversity in Atherosclerotic Mouse Aortas. Circ Res. 2020 Jul 17;127(3):402–26.

8. Poltavets AS, Vishnyakova PA, Elchaninov AV, Sukhikh GT, Fatkhudinov TKh. Macrophage Modification Strategies for Efficient Cell Therapy. Cells. 2020 Jun 24;9(6).

9. Wanderley CW, Colón DF, Luiz JPM, Oliveira FF, Viacava PR, Leite CA, et al. Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner. Cancer Res. 2018 15;78(20):5891–900.

10. Thorp EB. Mechanisms of failed apoptotic cell clearance by phagocyte subsets in cardiovascular disease. Apoptosis Int J Program Cell Death. 2010 Sep;15(9):1124–36.

11. Tajbakhsh A, Rezaee M, Kovanen PT, Sahebkar A. Efferocytosis in atherosclerotic lesions: Malfunctioning regulatory pathways and control mechanisms. Pharmacol Ther. 2018;188:12–25.

12. Bories G, Caiazzo R, Derudas B, Copin C, Raverdy V, Pigeyre M, et al. Impaired alternative macrophage differentiation of peripheral blood mononuclear cells from obese subjects. Diab Vasc Dis Res. 2012 Jul;9(3):189–95.

13. Odegaard JI, Chawla A. Alternative Macrophage Activation and Metabolism. Annu Rev Pathol. 2011;6:275–97.

14. Van den Bossche J, Baardman J, Otto NA, van der Velden S, Neele AE, van den Berg SM, et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. Cell Rep. 2016 11;17(3):684–96.

15. Dou F, Chen J, Cao H, Jia Q, Shen D, Liu T, et al. Anti-atherosclerotic effects of LXRα agonist through induced conversion of M1 macrophage to M2. Am J Transl Res. 2019 Jun 15;11(6):3825–40.

16. Xu M, Li X, Song L. Baicalin regulates macrophages polarization and alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury via inhibiting JAK/STAT pathway. Pharm Biol. 58(1):655–63.

ANNEXES

Annexe 1 : Valeurs brutes du dosage de cytokines

Donneurs	Condition	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
D1	M0	402,29	630	189,11
	M1	5000	9000	218
	M2	621,57	1255	182,44
	Mox	549,42	1410	165,78
D2	M0	310,14	916,67	157,44
	M1	6000	10000	202,44
	M2	338	736,67	164,67
	Mox	162,29	160	126,89
D3	M0	2117,5	4731	427,5
	M1	5000	5766	380
	M2	2162,5	4751	320
	Mox	1867,5	5001	150
D4	M0	697,5	3196	50
	M1	6000	4151	8,333
	M2	940	3041	120
	Mox	1215	2446	105

Les donneurs D1 et D2 correspondent à une expérience et les donneurs D3 et D4 à une seconde expérience.

Annexe 2 : Article

Atherosclerosis 309 (2020) 47–55

Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Two-photon excited fluorescence (TPEF) may be useful to identify macrophage subsets based on their metabolic activity and cellular responses in atherosclerotic plaques

Coraline Borowczyk[a,1], Jeanny Laroche-Traineau[a,1], Julien Brevier[b], Marie-Josée Jacobin-Valat[a], Sébastien Marais[c], Edouard Gerbaud[d], Gisèle Clofent-Sanchez[a], Florence Ottones[a,*]

[a] CRMSB CNRS UMR5536, INSB, Bordeaux, France
[b] UMR 7252, XLIM, Limoges, France
[c] Bordeaux Imaging Center, Bordeaux, France
[d] Centre de Recherche Cardio Thoracique, INSERM U 1045, Bordeaux, France

HIGHLIGHTS

- Foamy macrophages express pro-inflammatory and anti-inflammatory markers at low level.
- The human pathophysiological foamy macrophage model is optically distinguishable from M1 and M2 macrophages.
- Label-free two-photon imaging is a highly sensitive and non-destructive tool to assess macrophage metabolic functions.
- The optical redox ratio could be used as a new label-free imaging tool to identify vulnerable atheroma plaques.

ARTICLE INFO

Keywords:
Atherosclerosis
Human macrophages
Foam cells
Two-photon excited fluorescence
NADH and FAD

ABSTRACT

Background and aims: Atherosclerosis is characterized by the formation of lipid plaques within the arterial wall. In such plaques, the massive and continuous recruitment of circulating monocyte-derived macrophages induces inflammation, leading to plaque destabilization and rupture. Plaque vulnerability is linked to the presence of (i) a large lipid core that contains necrotic, "foamy" macrophages (FMs), (ii) a thin fibrous cap that cannot limit the prothrombotic lipid core, and potentially (iii) an imbalance between inflammatory and immunoregulatory macrophages. These opposite macrophage functions rely on the use of different energy pathways (glycolysis and oxidative phosphorylation, respectively) that may lead to different levels of the auto-fluorescent cofactors nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and flavin adenine dinucleotide (FAD). We hypothesized that high-resolution two-photon excited autofluorescence (TPEF) imaging of these cofactors may be used to monitor the metabolic activity and cellular responses of macrophages in atherosclerotic plaques.
Methods: Different models of human FMs were generated by exposure to acetylated or oxidized low-density lipoproteins (LDL), with/without human carotid extract (CE). Their phenotype and optical properties were compared with those of extremely polarized macrophages, inflammatory M1 ($M_{LPS+IFN\gamma}$) and immunoregulatory M2 ($M_{IL4+IL13}$).
Results: These FM models displayed an intermediate phenotype with low levels of M1 and M2 "specific" markers. Moreover, the NADH and FAD autofluorescence profiles of $FM_{oxLDL \pm CE}$ cells were significantly distinct from those of M1 and M2 macrophages.
Conclusions: TPEF imaging may be useful to follow the metabolic activity and cellular responses of the different macrophage subtypes present in atherosclerotic plaques in order to detect vulnerable areas.

* Corresponding author.
E-mail address: florence.ottones@u-bordeaux.fr (F. Ottones).
[1] Both authors contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.07.017
Received 21 April 2020; Received in revised form 10 July 2020; Accepted 16 July 2020
Available online 30 July 2020
0021-9150/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of medium- and large-sized arteries. Atherogenesis initiation relies on the retention and oxidation of low-density lipoproteins (LDL) at shear stress-submitted arterial areas, followed by activation of endothelial cells and recruitment of immune cells, leading to inflammation. Among these immune cells, blood monocytes are massively and persistently recruited, enter the vascular wall intima, and differentiate into macrophages [1,2]. These macrophages phagocytize oxidized LDL (oxLDL) and turn into foamy macrophages (FMs) that display impaired cholesterol efflux, sustain inflammation, and undergo apoptosis and necrosis, resulting in the formation of a rupture-prone necrotic core [3]. As macrophages play a central role in all atherogenesis stages, they are an ideal target for diagnostic and therapeutic strategies [4,5].

Macrophages were the first cellular immune actors discovered by Elie Metchnikoff in 1883 [6], and have been mainly defined by their ability to ingest exogenous debris and bacteria, a function involved in inflammation initiation and development [7]. Their role in immunoregulatory and wound-healing phenomena was described later [8]. Then, reference models were developed to mimic this functional dichotomy: i) classical activation with lipopolysaccharide (LPS) and/or interferon gamma (IFN-γ) to obtain inflammatory macrophages (M_1), and ii) activation with cytokines, such as interleukin (IL) 4, IL10, or IL13, to mimic macrophages involved in immunoregulation/suppression and repair (M_2) [9,10]. This oversimplified M_1-M_2 classification has been recently revisited on the basis of the results of omics and single-cell studies. Indeed, *in vivo*, the macrophage population displays a continuum from immunoregulatory to inflammatory cells with variations of gene expression (enzymes, cytokines, chemokines, transcription factors and membrane-expressed receptors). Therefore, it is difficult to find sets of markers that could be used as a signature for each type of activated macrophages [11–13].

Nevertheless, the M_1/M_2 paradigm is a useful framework to monitor the balance between immunoregulatory and inflammatory macrophages during the course of many non-infectious pathologies. For instance, in autoimmune diseases (systemic lupus erythematosus, encephalomyelitis, ankylosis spondylarthritis [14–16]), the level of inflammatory macrophages is indicative of disease progression. In atherosclerosis, the increase of M_1-specific markers has been associated with plaque progression [17–20]. Conversely, in a mouse model, atherosclerotic plaque regression is characterized by enhanced expression of M_2-associated genes [17,21,22]. However, as many macrophage sub-types share the same markers, with differences in single-cell expression [23], we think that marker-based immunostaining is not the best strategy to identify the functional state of macrophages present in atherosclerotic plaques. Indeed, due to atherogenesis complexity, phenotypic markers are expressed at different levels, depending on signals that vary in time and space. Moreover, such markers might be expressed also by dying cells that are widely present in vulnerable area. Therefore, other approaches are needed to determine and/or monitor in real time the functional status of macrophages that invade the atheroma plaque.

Recent studies have linked the cell functional status to a preferential energetic metabolism pathway [24,25]. Optical metabolic imaging is a well-suited tool to detect metabolic shifts towards glycolysis or oxidative phosphorylation (OXPHOS) through the measurements of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and flavin adenine dinucleotide (FAD) autofluorescence [26–30]. As M_1 and M_2 macrophages present very distinct autofluorescence properties [31], the over-representation of inflammatory macrophages at vulnerable areas of the arterial wall could lead to an optical redox ratio (ORR) of FAD/NADH distinct from that of macrophages at less vulnerable areas. However, it is not known whether the M_1 markers observed at the vulnerable area are expressed by FMs, which are major components of the lipid core. Indeed, in-depth studies of FM phenotypic status are lacking.

To precisely determine FM phenotype and function, we developed different *in vitro* models based on Monocyte-Derived Macrophages (MDMs) from healthy donors, stimulated with oxidized or acetylated LDL and with or without patient carotid extract to study, for the first time on the same cells, their phenotype and optical properties. For the phenotypic analyses, we used flow cytometry and fluorescent-labeled antibodies against several M_1 (CD40, CD86, CD197/CCR7) [9,20,32,33] and M_2 (CD163, CD206, CD200R) [5,9,20,34] markers. We then used TPEF microscopy to quantify NADH and FAD autofluorescence and to determine the ORR of M_1, M_2 and the different foamy macrophage models. We observed that FMs express M_1 and M_2 markers at similar low levels. Moreover, FM optical properties differ from those of M_1 and M_2 cells, suggesting a specific use of energy metabolism pathways, different from that of non-foamy inflammatory and immunoregulatory macrophages.

2. Materials and methods

2.1. Monocyte isolation and macrophage culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Paque Premium 1.073 density gradient (GE Healthcare, Sweden) from blood of healthy donors obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS) of Bordeaux. They were stored at −80 °C in RPMI-1640 medium (PAN BioTech, Dutcher, France) containing 50% endotoxin-free fetal calf serum and 10% DMSO until use. All experiments with human cells were performed following the Bordeaux University Ethical Guidelines. Monocytes were isolated from frozen PBMCs by negative selection using the Pan Monocyte Isolation Kit and LS columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Purified monocytes were cultured for 5–6 days in complete medium: RPMI-1640 medium (PAN BioTech, Dutcher, France) containing 10% (v/v) heat-inactivated AB human serum (EFS), penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 μg/mL) (Dutcher), and human recombinant M-CSF (Miltenyi Biotec) at the final concentration of 20 ng/mL to allow differentiation of purified monocytes into MDMs. Every 2–3 days, half of the medium was replaced with fresh differentiation medium containing 40 ng/mL of M-CSF. After the differentiation period, 24 h before stimulation, the medium was replaced with complete medium without M-CSF. For all experiments, 3–5 x 10^5 cells/mL were cultured on glass coverslips for TPEF analysis or on Primaria™ 6-well plates (Fisher Scientific, Illkirch, France) before harvesting for flow cytometry analyses.

2.2. Human biopsy collection

Human tissue specimens were provided by Prof Eric Ducasse, vascular surgeon at Pellegrin Hospital (Bordeaux, France). Human biopsies were harvested from patients who underwent endarterectomy after an acute vascular event at Pellegrin Hospital (Bordeaux, France). Patients were informed by the clinicians; if they did not express their opposition to research, the identified samples were immediately rinsed in sterile 1X PBS and stored at −80 °C before being pooled and processed for cell stimulation. All study procedures complied with the Declaration of Helsinki ethical standards.

2.3. Development of polarized macrophages and FM models

MDMs were stimulated in independent experiments. M1 polarization was obtained by stimulating MDMs with 20 ng/ml (400U/mL) of recombinant human (rh) IFN-γ (Miltenyi Biotec) and 100ng/mL LPS (cell culture-suitable, γ-irradiated, BioXtra LPS, Sigma Aldrich) for 48 h. For M2 polarization, MDMs were stimulated with 20 ng/ml of rhIL4 (100U/mL) and rhIL13 (8U/mL) (Miltenyi Biotec). Non-polarized macrophages ("M0") were used as control. The different FM models were generated by stimulating MDMs for 48 h with 50 μg/mL of human

oxidized or acetylated LDL (oxLDL or acLDL) (Clinisciences, Nanterre, France) with or without carotid extract (CE; prepared from a pool of biopsies from 25 patients). An additional model stimulated only with CE was also used. For these models, CE was placed in an insert that only allows the exchange of soluble factors. After 48 h of stimulation, the optical properties of the different models (M_0, M_1, M_2, M_{oxLDL}, $M_{oxLDL+CE}$, M_{acLDL}, $M_{acLDL+CE}$, and M_{CE}) were directly analyzed, or cells were harvested for flow cytometry analysis after immunostaining.

2.4. Characterization of cell surface markers by flow cytometry

The panel of surface molecules analyzed was defined based on their reported specificity as M1/M2 markers. Macrophages were harvested by gentle scraping after detachment using Versene. Cells were counted and resuspended in sterile 1X PBS, and stained with Viobility™ Fixable Dyes (405/520) (Miltenyi Biotec) to detect dead cells. Then, Tandem Signal Enhancer (Miltenyi Biotec) was used to block FcR-mediated antibody labeling and increase tandem-dye-conjugated antibody binding to macrophages, before incubation with a cocktail of specific antibodies (anti-CD86-VioBright 515, anti-CD163-PE, anti-CD40-PE-Vio770, anti-CD200R-APC, anti-CD206-APC-Vio770, and anti-CD197-PerCP-Vio700 from Miltenyi Biotec). As controls, some cells were incubated with a cocktail of equivalent concentrations of matched isotype control antibodies or without antibodies. Cells were fixed with 1% paraformaldehyde, and data were acquired with a MACS QUANT Analyzer 10 and analyzed with FlowLogic (Miltenyi). The percentage of positive cells and the mean fluorescence intensity (MFI) for each marker were used to define the different macrophage populations.

2.5. TPEF imaging of NADH and FAD autofluorescence

3D TPEF images were acquired with a Leica TCS SP5 system on an upright DM6000 microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). A tunable Ti:Sa MaiTai laser (Spectra-Physics, Irvine, USA) with 100 fs pulses and 80 MHz repetition rate was used as two-photon excitation source, tuned at 760 nm for NADH and at 860 nm for FAD. The laser light was focused through a 25X, 0.95 NA water immersion objective (Leica HCX IRAPO L). Autofluorescence was detected with an internal hybrid detector in standard mode set at 100% (12 bits dynamics) after passing through a tunable bandpass filter, set from 420 nm to 500 nm for NADH emission, and from 520 nm to 540 nm for FAD emission. The 3D images size was $620 \times 620 \times 40\ \mu m^3$ with a lateral resolution of 0.6 µm and an axial step size of 4 µm. A custom macro on Fiji was used for 3D image processing and to measure NADH and FAD volumic density AF, and to calculate the corresponding ORR for each cell. Autofluorescence measurements were normalized relative to the mean autofluorescence levels of M_1 cells to take into account the two-photon excitation variability. Data were from 300 to 1000 cells for each condition and blood donor. The mean autofluorescence and ORR values were then determined for each specific macrophage population.

2.6. Statistical analysis

Expression of surface markers, NADH and FAD fluorescence levels and ORR were compared among cell models using repeated-measures ANOVA followed by the Tukey's post-hoc test to correct for multiple testing. Analyses were performed using the R environment. Figures were made with Prism 8 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) and data are shown as the mean value (represented by a line segment) and their dispersion.

Principal Component Analysis (PCA) was performed using the R software with NADH and FAD autofluorescence data and ORR as quantitative variables, and stimulation conditions as qualitative variables. The first two dimensions of the PCA explained more than 95% of the total inertia and were enough to describe all data.

2.7. Ethics statement

All work with human tissues was approved by the local Ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outre Mer) and the French Research Ministry (Authorization number DC -2016- 2724). The ethics committee waived the need of the written consent by the patients because surgical waste no longer attached to the person is considered "RES NULLIUS"

3. Results

3.1. Set up and validation of the M_1 and M_2 models and comparison with the FM models by flow cytometry analysis of the surface expression of M_1 and M_2 markers

FMs are constitutive components of the lipid core, but it is not known whether the M_1/M_2 marker overexpression observed in vulnerable areas is due to inflammatory FMs. Therefore, different FM models were developed to compare by flow cytometry their phenotype with that of macrophages stimulated with IFN-γ and LPS (M_1) or with IL4 and IL13 (M_2). After incubation with an antibody cocktail against cell surface markers specific for M_1 (CD40, CD86 and CD197) and M_2 cells (CD163, CD206 and CD200R), the percentage of positive cells and the expression level (i.e. MFI) were quantified in each model.

CD40 and CD86 were expressed by almost all M_1 cells. CD40 was also detected in almost all cells in the different models, whereas the percentage of CD86-positive cells varied depending on the stimulation (Fig. 1A and B). Nevertheless, their expression levels were higher in M_1 cells than in the other conditions (4–16 times higher for CD40 (Fig. 2A) and 1.8 to 5 times higher for CD86 (Fig. 2B)). Similarly, the percentage of CD206-positive cells varied among models (Fig. 1E), and its expression level was 1.8–5 times higher in M_2 cells than in the other models (Fig. 2E). These data suggest that CD40, CD86 and CD206 are constitutively expressed by all macrophages, but their expression level depends on the activation condition.

On the other hand, CD197 was expressed by 37% of M_1 cells, and by very few cells in the other models (Fig. 1C), suggesting that its expression is induced by M_1-stimulation. Moreover, in CD197-positive cells, its expression level was comparable in all models (Fig. 2C). CD200R was expressed by 64% of M_2 cells (i.e. 2.5–8 times more cells than in the other conditions) (Fig. 1F), and its expression level was significantly higher in M_2 cells than in the other models (Fig. 2F).

In our hands, the percentage of CD163-positive cells was comparable after M_1 and M_2 stimulation, but was lower ($p < 0.001$) in M_1 than in M_0 cells (unstimulated) (Fig. 1D). Conversely, CD163 expression level was not significantly higher in M_2 cells than in all the other conditions (Fig. 2D). This first analysis allowed validating the M_1 and M_2 models used in this study through the identification of robust M_1 and M_2 markers.

Then, to define FM functional phenotype, the expression of M_1 and M_2 markers was compared between FM models and M_1 and M_2 cells. Almost all cells in the different FM models expressed CD40 and CD206 and, to a lesser extent CD86 (Fig. 1A, B and E), but at a lower expression level compared with M_1 (for CD40 and CD86) and M_2 cells (for CD206) (Fig. 2 A, B and E). Although only 30–50% of FMs expressed CD163 (Fig. 1D), the expression level was comparable to that of M_1 and M_2 cells (Fig. 2D). In all FM models, few cells expressed CD200R (Fig. 1F) and CD197 (Fig. 1C), and their expression level was low (Fig. 2C and F).

This analysis also highlighted slight differences between the $M_{acLDL \pm CE}$ and $M_{oxLDL \pm CE}$ models. Specifically, the percentage of CD86-positive cells was statistically lower in $M_{acLDL \pm CE}$ than in M_1 cells ($p < 0.001$), but not between $M_{oxLDL \pm CE}$ and M_1 cells (Fig. 1B). This suggests that using oxLDL, the percentage of CD86-positive cells among FMs is closer to that obtained by M_1 stimulation. Moreover, the percentage of CD206-positive cells was significantly lower in all FM models ($M_{ox/acLDL \pm CE}$) than in M_2 cells, although this difference was

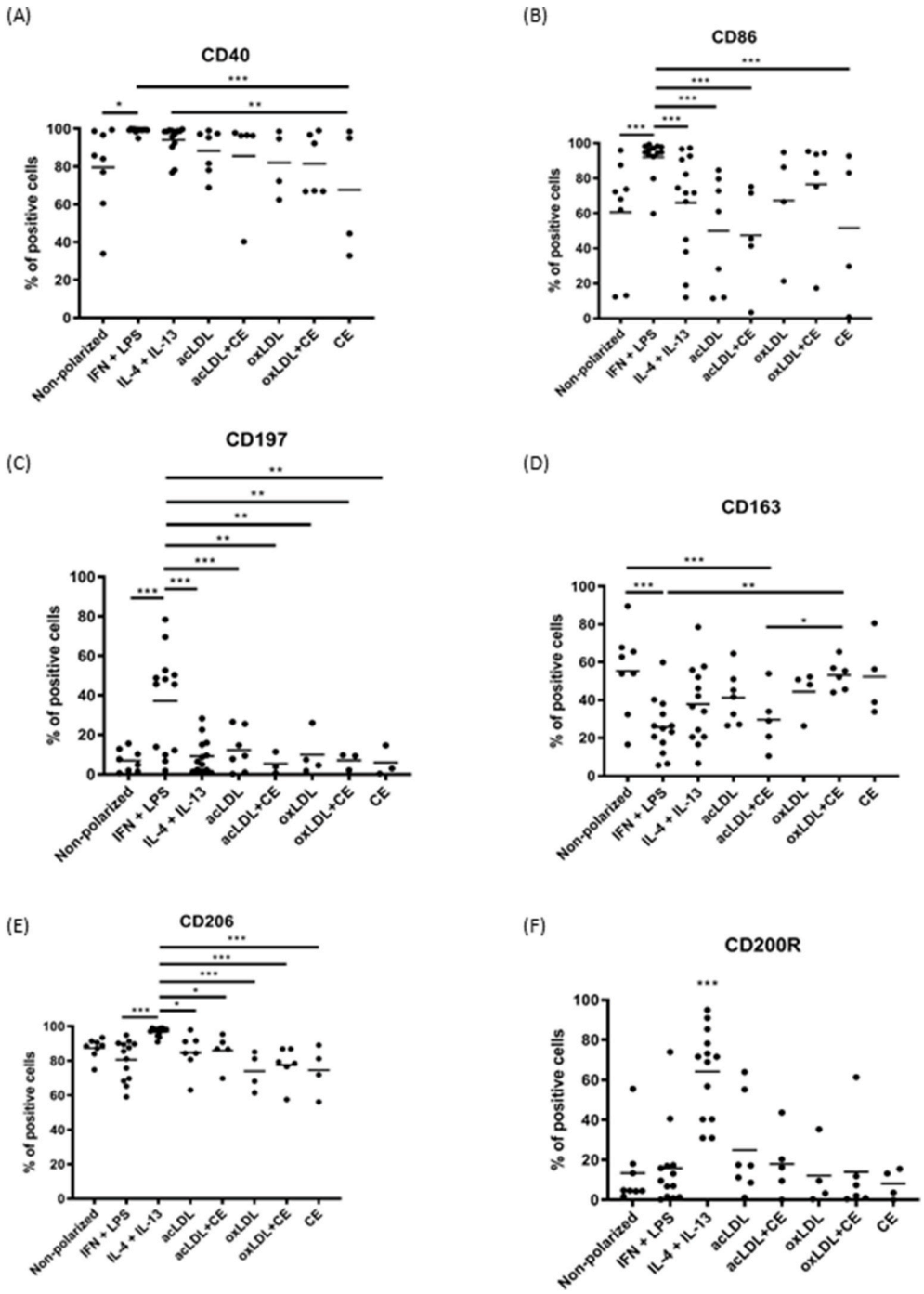


Fig. 1. Expression of inflammatory and immunoregulatory markers on the surface of non-polarized, inflammatory, immunoregulatory and foamy macrophages by flow cytometry.

Percentage of cells that express inflammatory (CD40 (A), CD86 (B), CD197 (C)) and regulatory (CD163 (D), CD206 (E), CD200R (F)) markers. The horizontal line indicates the mean value. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. acLDL = acetylated LDL, oxLDL = oxidized LDL, CE = carotid extract.

more important between $M_{oxLDL \pm CE}$ and M_2 cells ($p < 0.001$) than between $M_{acLDL \pm CE}$ and M_2 cells ($p < 0.05$) (Fig. 1E). Thus, stimulation with acLDL (with or without CE) seems to be closer to M_2 stimulation, while stimulation with oxLDL (with or without CE) seems to be closer to M_1 stimulation.

Moreover, robust M_1 and M_2 markers (CD86/CD40 and CD206, respectively) were co-expressed in all FM models, although their expression level was lower than in M_1 and M_2 cells (see representative scatter-plot images in Fig. 3).

To conclude, none of the studied M_1 or M_2 markers can be used to specifically identify FMs. Indeed, FMs express M_1 and M_2 markers, but at a level similar to that of non-activated macrophages (M_0). Macrophages stimulated with oxLDL (the more pathophysiological models) are only slightly more inflammatory than those stimulated with acLDL.

3.2. Optical properties of FMs, M_1 and M_2 macrophages analyzed by TPEF imaging of NADH and FAD autofluorescence

Macrophages (300–1000 cells per condition) were analyzed by

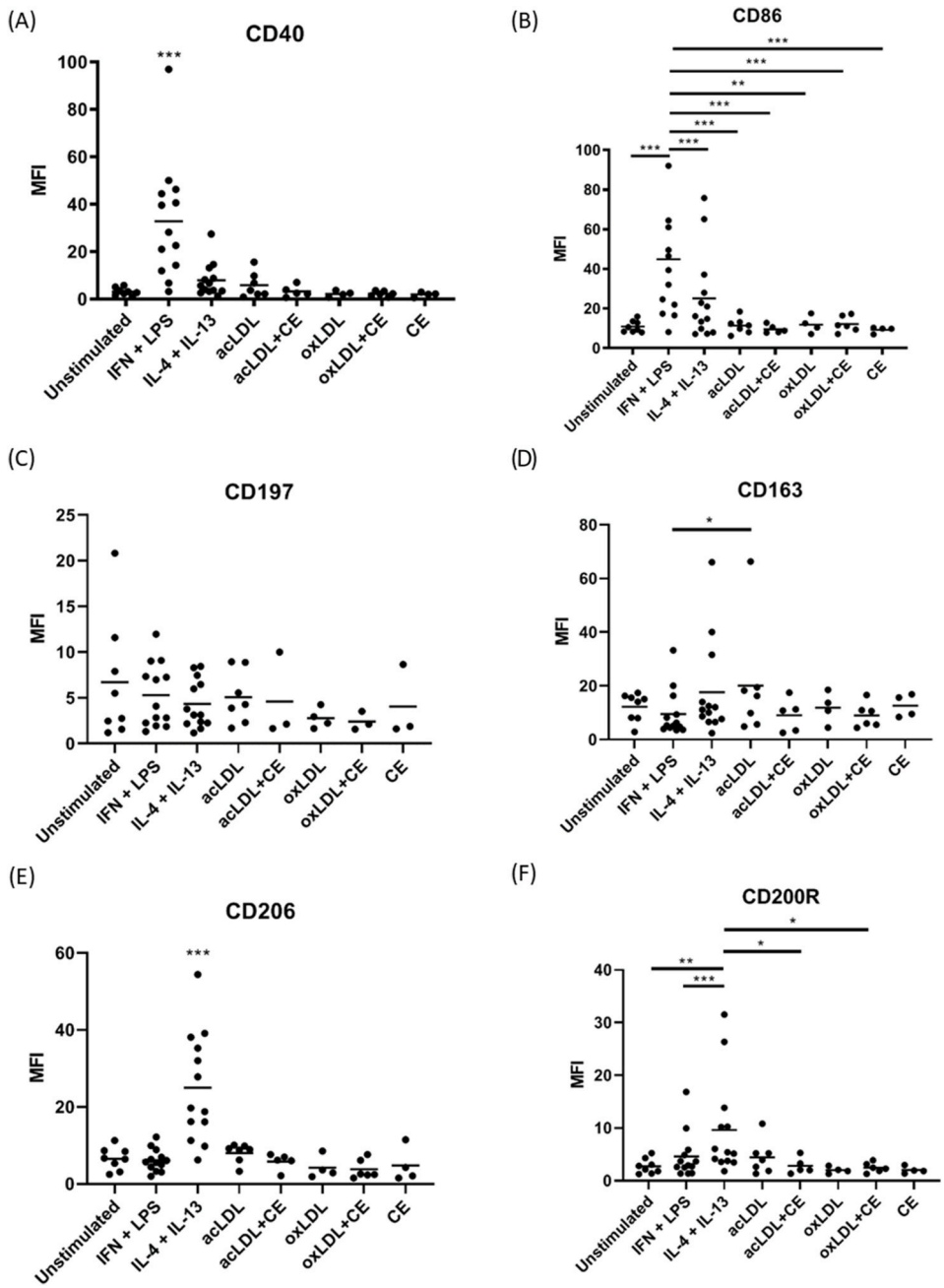


Fig. 2. Expression level of inflammatory and immunoregulatory markers on the surface of non-polarized, inflammatory, immunoregulatory and foamy macrophage models by flow cytometry.

Mean Fluorescence Intensity (MFI) of inflammatory (CD40 (A), CD86 (B), CD197 (C)) and regulatory (CD163 (D), CD206 (E), CD200R (F)) markers in positive cells. The horizontal line indicates the mean value. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$. acLDL = acetylated LDL, oxLDL = oxidized LDL, CE = carotid extract.

TPEF microscopy to obtain 3D images of NADH and FAD autofluorescence. The overlay of NADH and FAD fluorescence images (Fig. 4A–C for a representative optical readout analysis) suggested that M_1, M_2 and M_{oxLDL} cells exhibited different optical properties. This result was confirmed when scatter-plots of FAD and NADH autofluorescence (Fig. 4D) were generated. Comparison of these measurements showed that NADH fluorescence level clearly differentiated M_1 and M_2 cells (Fig. 5A; $p < 0.01$). NADH fluorescence level in $M_{oxLDL \pm CE}$ and $M_{acLDL \pm CE}$ cells was similar to that of M_1 cells. Conversely, M_{CE} cells showed values closer to those of M_2 cells (Fig. 5A). Of note, NADH fluorescence level in $M_{oxLDL+CE}$ and $M_{acLDL+CE}$ cells was lower than in M_{oxLDL} and M_{acLDL} cells, respectively. This suggests that in the presence of CE, macrophages use other pathways than glycolysis to produce energy. FAD fluorescence levels only allowed distinguishing $M_{oxLDL \pm CE}$ from all the other conditions (Fig. 5B; $p < 0.5$ to $p < 0.001$). FAD fluorescence levels were higher in $M_{oxLDL+CE}$ than in M_{oxLDL} cells, and in $M_{acLDL+CE}$ than in M_{acLDL} cells, suggesting metabolism modifications in the presence of CE. Finally, the ORR allowed differentiating M_1, M_2 and $M_{oxLDL \pm CE}$ cells (Fig. 5C; $p < 0.5$ to $p < 0.001$). Similarly, PCA of these optical data allowed the visual discrimination of the M_1, M_2, M_{oxLDL} and $M_{oxLDL+CE}$ models in four distinct quadrants (Fig. 5D). The other FM models and M_{CE} were distributed through a continuum between the M_1 and M_2 models. In summary, TPEF imaging of NADH and FAD autofluorescence allowed differentiating the pathophysiological $M_{oxLDL \pm CE}$ models from the M_1 and M_2 models that can also be discriminated with this approach.

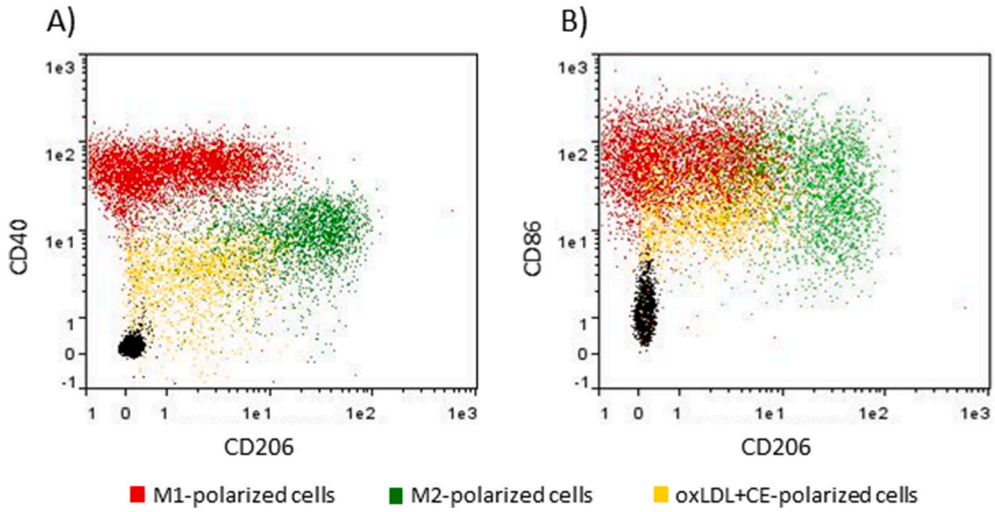


Fig. 3. Overlays of M1, M2 and oxLDL + CE-stimulated macrophages after labeling with the antibody cocktail against M1 and M2 surface markers. Representative scatterplots of the MFI values obtained with anti-CD40 and anti-CD206 antibodies (A) and with anti-CD86 and anti-CD206 antibodies (B) in the three models.

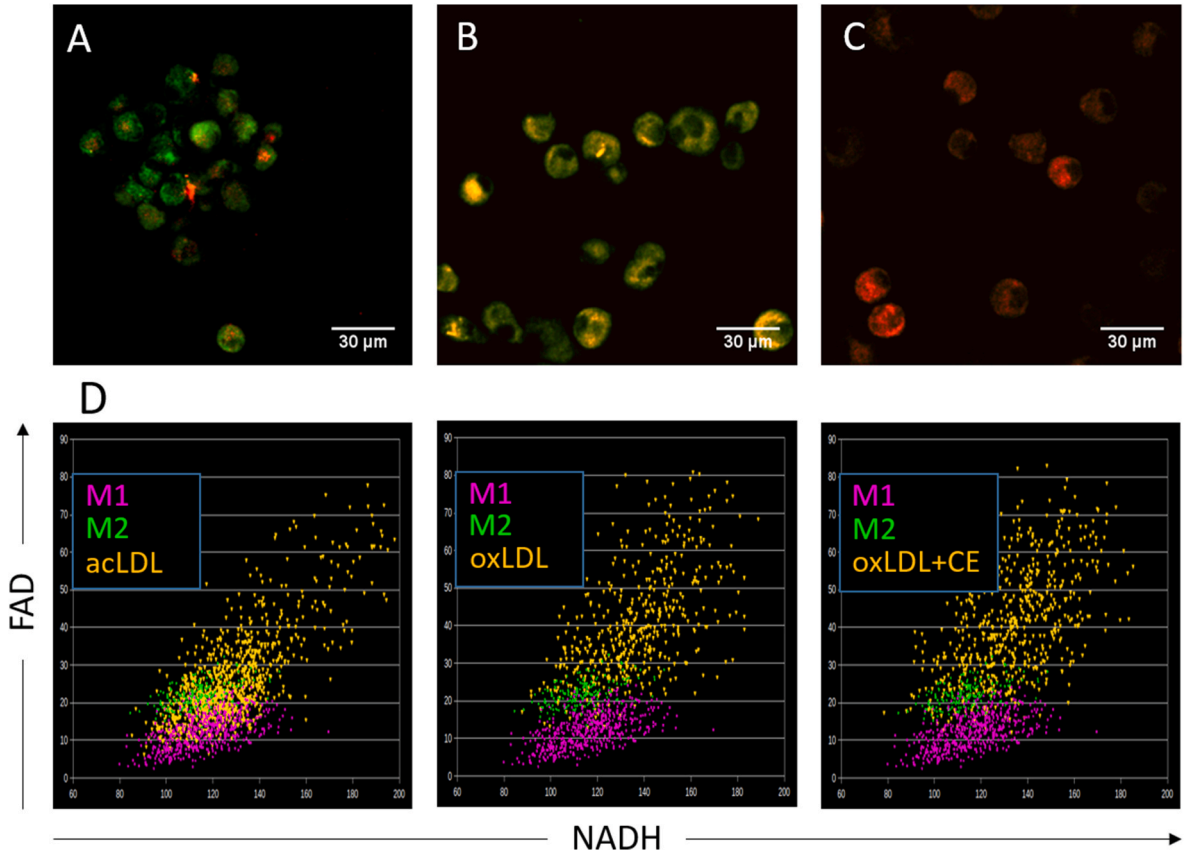


Fig. 4. Optical readouts by TPEF of NADH and FAD autofluorescence in macrophages.
(A-C) Representative overlay images of NADH (green) and FAD (red) autofluorescence in M_1 (IFN-γ + LPS) (A), M2 (IL-4 + IL-13) (B) and $M_{oxLDL+CE}$ macrophages (C) obtained by TPEF. These three populations exhibit different NADH and FAD autofluorescence levels. Scale bars, 50 µm. (D) Scatter-plots of FAD and NADH autofluorescence in M_1, M_2 and different FM models. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

4. Discussion

The detection of high-risk atherosclerotic plaques remains a critical issue to limit myocardial infarction, stroke, and death [35]. Macrophages are massively present in atherosclerotic plaques [23] and are implicated in all disease stages [36]. They form a heterogeneous population in which the delicate balance between inflammatory and immunoregulatory macrophages may control plaque progression. Many M_1 markers are detected in progressing plaques, in humans and mice. Moreover these markers are specifically concentrated in the plaque vulnerable lipid-rich area in humans [4]. In mice, plaque progression is the functional consequence of M_1 polarization [17,32,37]. However,

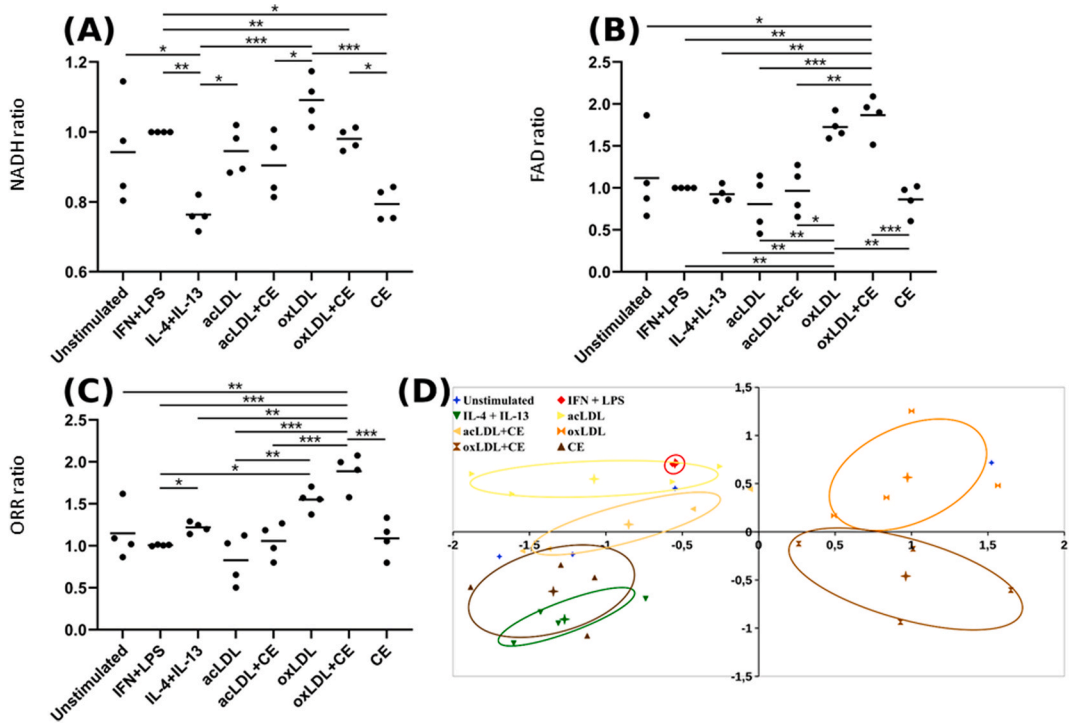


Fig. 5. NADH and FAD autofluorescence in the different macrophage populations.
(A-C) Boxplots of NADH (A) and FAD (B) autofluorescence intensity and ORR value ratios (C) in the different macrophage models. The horizontal line indicates the mean value. (D) PCA of the NADH/FAD autofluorescence and ORR data showing the clear separation of the M_1, M_2, M_{oxLDL} and $M_{oxLDL+CE}$ models in four quadrants. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. acLDL = acetylated LDL, oxLDL = oxidized LDL, CE = carotid extract.

few studies have focused on FM phenotype. It has been shown that macrophages stimulated by oxLDL and cholesterol crystals share common markers with the classically-activated M_1 cells, such as CD86 and MHC-II expression and TNFα secretion [32]. Later, Chinetti et al. found that M_1 or M_2 markers may be expressed by FMs, but studies on the functional differences between M_1-or M_2-derived FMs are still rare. It was suggested that these cells might not handle oxLDL with the same efficiency [2,38].

In this study, different experimental pathophysiological models of FMs were phenotypically characterized using a broad panel of M_1 and M_2 markers and compared with the M_1 and M_2 reference models. Our results indicate that compared with unstimulated M_0 cells, FMs present a mix phenotype with lower expression of M_1 (i.e. CD40, CD86 and CD197) and M_2 markers (i.e. CD163, CD206 and CD200R).

As many recent immunometabolism studies have linked these opposite functions to a differential use of energy metabolism pathways [25], we hypothesized that optical metabolic imaging could be useful for the diagnosis/prognosis of diseases that implicate a disequilibrium between inflammatory and immunoregulatory cells [29]. This hypothesis needed to be tested in conditions that mimic the pathological microenvironment. In atherosclerosis, depending on its localization in the plaque and the disease stage, each macrophage can be exposed to different environmental signals in an unknown order. In lipid-rich vulnerable areas, macrophages might modify their phenotype and their metabolism to adapt their function towards phagocytosis and elimination of extracellular lipids [39]. However, these FMs end up being no longer efficient and undergo apoptosis. Therefore, it seems more reliable to base the diagnosis on instantaneous functional events rather than on monitoring markers that could be retained on the membrane of dead cells present in the necrotic core. Moreover, as many markers are shared by different macrophage subsets, conclusions should not be based on data obtained by assessing one or two markers.

In the present study, TPEF imaging of NADH and FAD autofluorescence showed that compared with M_1 and M_2 cells, the tested FM experimental models showed specific fluorescence profiles, in addition to their distinct phenotypic features. FAD/NADH ORR was lower in M_1 than M_2 cells, essentially because of NADH accumulation from the glycolysis pathway in M_1 cells, as described by Varone et al. [27]. Conversely, in M_2 macrophages, which rely mainly on fatty-acid oxidation and mitochondrial respiration [40], FAD fluorescence level was similar and NADH fluorescence level was lower than in M_1 cells, resulting in a higher ORR. In FMs, intermediate-to-high NADH and very high FAD autofluorescence levels were observed with oxLDL (with or without CE). Interestingly, the ORR of the more pathophysiological models (M_{oxLDL} and $M_{oxLDL+CE}$) was very different from that of non-foamy M_1 and M_2 cells. Moreover, phenotypic analyses showed slight differences between $M_{oxLDL \pm CE}$ and $M_{acLDL \pm CE}$ macrophages, suggesting that $M_{oxLDL \pm CE}$ cells are closer to the inflammatory phenotype than $M_{acLDL \pm CE}$ (Fig. 1B and E). In agreement, it has been shown that intracellular cathepsin activities are blunted in blood MDMs stimulated with oxLDL, but not with acLDL. This results in reduced lysosomal functions, leading to cellular stress responses and priming towards a pro-inflammatory phenotype [41]. These authors showed that inhibition of cathepsins leads to a perturbation of mitochondrial dynamics (increase of mitochondrial fragmentation and impairment of mitophagy) and OXPHOS pathway alterations [41]. This may explain why we could not observe mitochondrial respiration in $M_{oxLDL \pm CE}$ cells (data not shown), but raises the question of the origin of the high FAD autofluorescence level in these cells. According to the literature, FAD fluorescence signal is due to lipoamide dehydrogenase (50%), the electron transfer flavoprotein (25%), and flavoproteins not connected to metabolism (25%). Noteworthily, the contribution of the electron transport chain complex II (succinate dehydrogenase) to the total FAD autofluorescence is negligible [29,42]. FAD autofluorescence may originate from lipopigments, such as lipofuscin/ceroid [43] that present optical properties similar to FAD [44]. These lipopigments derive from the lysosomal accumulation of aggregates rich in oxidized lipids and oxidized proteins [41,45]. Lipofuscin/ceroid detection is of particular

interest because the decrease of ceroids by cysteamine reduces aortic lesions [46]. Accordingly, their production could be indicative of plaque progression. Future studies should precisely determine the origin of the autofluorescence leading to the specific ORR observed in $M_{oxLDL \pm CE}$ cells and their specific metabolism.

Importantly, our results suggest that TPEF imaging of NADH and FAD, without the need of fluorescence lifetime imaging microscopy, can discriminate different macrophage subsets the balance of which is crucial in atherosclerotic plaque progression. Visualization of the macrophage metabolic signature by measuring NADH and FAD autofluorescence has already been validated *in vivo* in a mouse model of breast cancer using a mammary imaging window [47]. In the field of atherosclerosis, TPEF imaging may be possible in humans by developing a dedicated device to monitor the macrophage metabolic cellular activity. Cell metabolism monitoring may be useful to better understand the progression of atherosclerotic plaques and to identify "vulnerable" patients from the general population for personalized medicine (optimized selection and dosage of treatments).

Financial support

This study was supported by the Fédération Française de Cardiologie and was performed in the framework of the Laboratory of Excellence TRAIL ANR-10-LABX-57.

Author contributions

CB, JLT, FO performed the *in vitro* experiments and data analysis. SM performed the images acquisition and JB performed image data and statistical analysis. CB, JLT, JB, FO, GCS and EG designed the study. FO, GCS and EG wrote the grant applications. All authors were involved in writing the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declared they do not have anything to disclose regarding conflict of interest with respect to this manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank David-Alexandre Tregouet who contributed to the statistical analysis of flow cytometry experiments.

References

[1] P. Libby, G.K. Hansson, Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers, Circ. Res. 116 (2) (2015 Jan 16) 307–311.
[2] M.C. Flynn, G. Pernes, M.K.S. Lee, P.R. Nagareddy, A.J. Murphy, Monocytes, macrophages, and metabolic disease in atherosclerosis, Front. Pharmacol. 10 (2019) 666.
[3] E. Falk, Pathogenesis of atherosclerosis, J. Am. Coll. Cardiol. 47 (8 Suppl) (2006 Apr 18) C7–C12.
[4] E.A.L. Biessen, K. Wouters, Macrophage complexity in human atherosclerosis: opportunities for treatment? Curr. Opin. Lipidol. 28 (5) (2017 Oct) 419–426.
[5] K.R. Peterson, M.A. Cottam, A.J. Kennedy, A.H. Hasty, Macrophage-targeted therapeutics for metabolic disease, Trends Pharmacol. Sci. 39 (6) (2018) 536–546.
[6] F. Merien, A journey with Elie Metchnikoff: from innate cell mechanisms in infectious diseases to quantum biology, Front. Publ. Heal. 4 (2016) 125.
[7] G.B. Mackaness, Cellular immunity and the parasite, Adv. Exp. Med. Biol. 93 (1977) 65–73.
[8] S. Gordon, Alternative activation of macrophages, Nat. Rev. Immunol. 3 (1) (2003 Jan) 23–35.
[9] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, M. Locati, The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, Trends Immunol. 25 (12) (2004 Dec) 677–686.
[10] A. Classen, J. Lloberas, A. Celada, Macrophage activation: classical versus alternative, Methods Mol. Biol. Clifton NJ 531 (2009) 29–43.
[11] M.B. Ka, A. Daumas, J. Textoris, J.-L. Mege, Phenotypic diversity and emerging new tools to study macrophage activation in bacterial infectious diseases, Front. Immunol. 5 (2014) 500.
[12] D.M. Mosser, J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation, Nat. Rev. Immunol. 8 (12) (2008 Dec) 958–969.
[13] D.A. Hume, The many alternative faces of macrophage activation, Front. Immunol. 6 (2015) 370.
[14] Z. Jiang, J.X. Jiang, G.-X. Zhang, Macrophages: a double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis, Immunol. Lett. 160 (1) (2014 Jul) 17–22.
[15] S. Lin, M. Qiu, J. Chen, IL-4 modulates macrophage polarization in ankylosing spondylitis, Cell Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell Physiol. Biochem. Pharmacol. 35 (6) (2015) 2213–2222.
[16] F. Li, Y. Yang, X. Zhu, L. Huang, J. Xu, Macrophage polarization modulates development of systemic lupus erythematosus, Cell Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell Physiol. Biochem. Pharmacol. 37 (4) (2015) 1279–1288.
[17] M. Peled, E.A. Fisher, Dynamic aspects of macrophage polarization during atherosclerosis progression and regression, Front. Immunol. 5 (2014) 579.
[18] K.Y. Cho, H. Miyoshi, S. Kuroda, H. Yasuda, K. Kamiyama, J. Nakagawara, et al., The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery, J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc. 22 (7) (2013 Oct) 910–918.
[19] C.W. Lee, I. Hwang, C.-S. Park, H. Lee, D.-W. Park, S.-J. Kang, et al., Macrophage heterogeneity of culprit coronary plaques in patients with acute myocardial infarction or stable angina, Am. J. Clin. Pathol. 139 (3) (2013 Mar) 317–322.
[20] J.L. Stöger, M.J.J. Gijbels, S. van der Velden, M. Manca, C.M. van der Loos, E.A.L. Biessen, et al., Atherosclerosis 225 (2) (2012 Dec 1) 461–468.
[21] J.E. Feig, S. Parathath, J.X. Rong, S.L. Mick, Y. Vengrenyuk, L. Grauer, et al., Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques, Circulation 123 (9) (2011 Mar 8) 989–998.
[22] J.E. Feig, Y. Vengrenyuk, V. Reiser, C. Wu, A. Statnikov, C.F. Aliferis, et al., Regression of atherosclerosis is characterized by broad changes in the plaque macrophage transcriptome, PloS One 7 (6) (2012 Jun 27) e39790.
[23] L. Willemsen, M.P. de Winther, Macrophage subsets in atherosclerosis as defined by single-cell technologies, J. Pathol. 250 (2020 Jan 31) 705–714.
[24] X. Geeraerts, E. Bolli, S.-M. Fendt, J.A. Van Ginderachter, Macrophage metabolism as therapeutic target for cancer, atherosclerosis, and obesity, Front. Immunol. (2017 Mar 15) 8.
[25] L.A.J. O'Neill, R.J. Kishton, J. Rathmell, A guide to immunometabolism for immunologists, Nat. Rev. Immunol. 16 (9) (2016) 553–565.
[26] I. Georgakoudi, K.P. Quinn, Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state, Annu. Rev. Biomed. Eng. 14 (1) (2012 Jul 18) 351–367.
[27] A. Varone, J. Xylas, K.P. Quinn, D. Pouli, G. Sridharan, M.E. McLaughlin-Drubin, et al., Endogenous two-photon fluorescence imaging elucidates metabolic changes related to enhanced glycolysis and glutamine consumption in precancerous epithelial tissues, Canc. Res. 74 (11) (2014 Jun 1) 3067–3075.
[28] Z. Liu, D. Pouli, C.A. Alonzo, A. Varone, S. Karaliota, K.P. Quinn, et al., Mapping metabolic changes by noninvasive, multiparametric, high-resolution imaging using endogenous contrast, Sci. Adv. 4 (3) (2018 Mar 7).
[29] O.I. Kolenc, K.P. Quinn, Evaluating cell metabolism through autofluorescence imaging of NAD(P)H and FAD, Antioxidants Redox Signal. 30 (6) (2019 Feb 20) 875–889.
[30] A.J. Walsh, R.S. Cook, H.C. Manning, D.J. Hicks, A. Lafontant, C.L. Arteaga, et al., Optical metabolic imaging identifies glycolytic levels, sub-types and early treatment response in breast cancer, Canc. Res. 73 (20) (2013 Oct 15) 6164–6174.
[31] A. Alfonso-García, T.D. Smith, R. Datta, T.U. Luu, E. Gratton, E.O. Potma, et al., Label-free identification of macrophage phenotype by fluorescence lifetime imaging microscopy, J. Biomed. Optic. 21 (4) (2016 Apr 30) 46005.
[32] S. Colin, G. Chinetti-Gbaguidi, B. Staels, Macrophage phenotypes in atherosclerosis, Immunol. Rev. 262 (1) (2014 Nov) 153–166.
[33] D.Y.S. Vogel, J.E. Glim, A.W.D. Stavenuiter, M. Breur, P. Heijnen, S. Amor, et al., Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared, Immunobiology 219 (9) (2014 Sep 1) 695–703.
[34] S. Colin, M. Fanchon, L. Belloy, A.E. Bochem, C. Copin, B. Derudas, et al., HDL does not influence the polarization of human monocytes toward an alternative phenotype, Int. J. Cardiol. 172 (1) (2014 Mar 1) 179–184.
[35] Z.A. Fayad, F.K. Swirski, C. Calcagno, C.S. Robbins, W. Mulder, J.C. Kovacic, Monocyte and macrophage dynamics in the cardiovascular system: JACC macrophage in CVD series (Part 3), J. Am. Coll. Cardiol. 72 (18) (2018 30) 2198–2212.
[36] J. Nagenborg, P. Goossens, E.A.L. Biessen, M.M.P.C. Donners, Heterogeneity of atherosclerotic plaque macrophage origin, phenotype and functions: implications for treatment, Eur. J. Pharmacol. 816 (2017 Dec 5) 14–24.
[37] K.J. Moore, F.J. Sheedy, E.A. Fisher, Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance, Nat. Rev. Immunol. 13 (10) (2013 Oct) 709–721.
[38] G. Chinetti-Gbaguidi, S. Colin, B. Staels, Macrophage subsets in atherosclerosis, Nat. Rev. Cardiol. 12 (1) (2015 Jan) 10–17.
[39] G.J. Koelwyn, E.M. Corr, E. Erbay, K.J. Moore, Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis, Nat. Immunol. 19 (6) (2018) 526–537.
[40] J. Van den Bossche, L.A. O'Neill, D. Menon, Macrophage immunometabolism: where are we (going)? Trends Immunol. 38 (6) (2017) 395–406.
[41] T. Weiss-Sadan, D. Maimoun, D. Oelschlagel, F. Kaschani, D. Misiak, H. Gaikwad, et al., Cathepsins drive anti-inflammatory activity by regulating autophagy and mitochondrial dynamics in macrophage foam cells, Cell Physiol. Biochem. Cell. Physiol. Biochem. 53 (3) (2019 Sep 18) 550–572.
[42] W.S. Kunz, W. Kunz, Contribution of different enzymes to flavoprotein fluorescence of isolated rat liver mitochondria, Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 841 (3) (1985 Sep 6) 237–246.
[43] S.S. Seehafer, D.A. Pearce, You say lipofuscin, we say ceroid: defining autofluorescent storage material, Neurobiol. Aging 27 (4) (2006 Apr 1) 576–588.
[44] W.L. Rice, D.L. Kaplan, I. Georgakoudi, Two-photon microscopy for non-invasive,

quantitative monitoring of stem cell differentiation, PloS One 5 (4) (2010 Apr 16) e10075.
[45] J. König, C. Ott, M. Hugo, T. Jung, A.-L. Bulteau, T. Grune, et al., Mitochondrial contribution to lipofuscin formation, Redox Biol. 11 (2017 Jan 25) 673–681.
[46] Y. Wen, F. Ahmad, Z. Mohri, P.D. Weinberg, D.S. Leake, Cysteamine inhibits lysosomal oxidation of low density lipoprotein in human macrophages and reduces atherosclerosis in mice, Atherosclerosis 291 (2019 Dec 1) 9–18.
[47] J.M. Szulczewski, D.R. Inman, D. Entenberg, S.M. Ponik, J. Aguirre-Ghiso, J. Castracane, et al., In vivo visualization of stromal macrophages via label-free FLIM-based metabolite imaging, Sci. Rep. 6 (1) (2016 May 25) 1–9.

Développement d'un modèle physiopathologique de macrophages spumeux de l'athérosclérose: caractérisation phénotypique et fonctionnelle et sélection d'anticorps humains spécifiques

Résumé : L'athérosclérose est une inflammation chronique liée à la rétention de LDL oxydées à la surface de la paroi des vaisseaux artériels conduisant à la formation de plaques dites « athérosclérotiques » susceptibles de se rompre et de conduire à des accidents cardiovasculaires (AVC, infarctus, embolies pulmonaires). Les macrophages, après avoir infiltré la paroi des artères, phagocytent les LDL oxydées et deviennent spumeux. Ils sont donc particulièrement impliqués dans la formation de ces plaques et leur évolution vers la rupture. Cette thèse porte sur la mise au point d'un modèle physiopathologique de macrophages spumeux de manière à développer de nouvelles stratégies de diagnostic et de thérapie ciblant cette population. Pour cela, des macrophages primaires humains ont été stimulés avec des LDL oxydées ainsi qu'un extrait de pool de plaques d'athérome carotidiennes humaines, de manière à mimer le microenvironnement pathologique. Nous avons ainsi mis en évidence que ces macrophages spumeux coexpriment à leur surface les marqueurs inflammatoires CD40, CD86 et CD197, et les marqueurs immunorégulateurs CD163, CD206 et CD200R, mais avec un niveau basal. Nous avons ensuite abordé leur caractérisation fonctionnelle par l'observation, en microscopie de fluorescence bi-photonique, d'intermédiaires du métabolisme énergétique naturellement autofluorescents : le NADH et le FAD. Ces cofacteurs enzymatiques sont produits différentiellement selon les voies métaboliques empruntées par les cellules (glycolyse pour les M1, respiration mitochondriale pour les M2). Nous avons montré que les M1, les M2 et notre modèle de macrophages spumeux, sont distinguables optiquement en microscopie bi-photonique. Ces résultats permettent d'envisager le développement de nouveaux dispositifs de diagnostic *in vivo* basés sur l'imagerie optique de l'activité cellulaire métabolique des macrophages. Par ailleurs, nous avons obtenu, par la technologie de phage-display, des anticorps humains qui seront utiles à la poursuite de la caractérisation de ce modèle et pour le développement de nouvelles stratégies de stratification des patients et d'immunothérapie. Pour cela, les différences métaboliques des sous-populations macrophagiques observées en microscopie bi-photonique seront mises à profit pour l'élaboration d'un test fonctionnel permettant de sélectionner les anticorps capables de restaurer une fonction athéroprotective (induction d'une immunorégulation ou de l'efflux de cholestérol).

Development of a pathophysiological model of foamy macrophages of atherosclerosis: phenotypic and functional characterization and selection of specific human antibodies

Summary: Atherosclerosis is a chronic inflammation linked to the retention of oxidized LDL on the surface of the arterial wall leading to the formation of so-called "atherosclerotic" plaques prone to rupture and to further cardiovascular events (stroke, heart attack, pulmonary embolism). Macrophages infiltrate the arterial wall, phagocytose oxidized LDL and become foamy. They are therefore particularly involved in the formation of these plaques and their evolution towards rupture. This thesis focuses on the development of a pathophysiological model of foamy macrophages in order to develop new diagnostic and therapeutic strategies targeting this population. Human primary macrophages were stimulated with oxidized LDL as well as a pool extract of human carotid atheromatous plaques, to mimic the pathological microenvironment. We have thus demonstrated that these foamy macrophages coexpress on their surface the inflammatory markers CD40, CD86 and CD197, and the immunoregulatory markers CD163, CD206 and CD200R, but with a basal level. We then focused on their functional characterization by analyzing naturally autofluorescent NADH and FAD energy metabolism intermediates, using two-photon fluorescence microscopy. These enzymatic cofactors are produced differentially depending on the metabolic pathways used by the cells (glycolysis for M1, mitochondrial respiration for M2). We have shown that M1, M2 and our model of foamy macrophages, are optically distinguishable under two-photon microscopy. These results allow us to consider the development of new *in vivo* diagnostic devices based on optical imaging for monitoring the metabolic cellular activity of macrophages. In addition, we have obtained, by phage-display technology, human antibodies that will be useful to further characterize this model and for the development of new strategies for patient stratification and immunotherapy. For this, the metabolic differences of the macrophage subpopulations observed in two-photon microscopy will be used to develop a functional assay allowing the selection of antibodies capable of restoring an atheroprotective function (induction of immunoregulation or cholesterol efflux).