



HAL
open science

Métabolisme des lipoprotéines et biomarqueurs dans les maladies cardiovasculaires

Danie Champain

► **To cite this version:**

Danie Champain. Métabolisme des lipoprotéines et biomarqueurs dans les maladies cardiovasculaires. Cardiologie et système cardiovasculaire. 2012. dumas-01220990

HAL Id: dumas-01220990

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01220990v1>

Submitted on 27 Oct 2015

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.



CONSERVATOIRE NATIONAL
DES ARTS ET METIERS
Centre Regional Associé de Lille



THE UNIVERSITY OF
WESTERN AUSTRALIA
Achieving International Excellence

MEMOIRE

Pour le

DIPLOME d'INGENIEUR CNAM

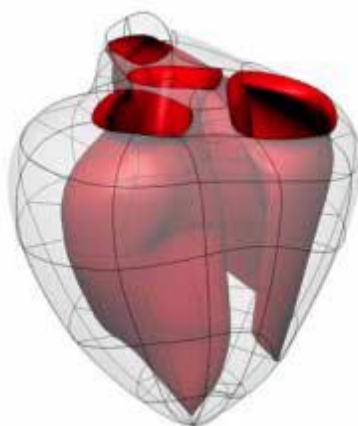
Spécialité : SCIENCES ET TECHNIQUES DU VIVANT

Option : GENIE BIOLOGIQUE

Présenté par

Danie CHAMPAIN

METABOLISME DES LIPOPROTEINES ET BIOMARQUEURS DANS LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES



Soutenu le 3 Janvier 2012

Jury :

Présidente du jury :

Membres :

Membres extérieurs :

Dr Marie-Irène MALEWIAK MCF CNAM Paris
Dr Joël MAZURIER DR CNRS UMR n°8576 Lille 1
Dr Mathieu CARPENTIER MCF Lille 1

Dr Gerald WATTS Professor and Chair of Medicine
Dr Zouher MAJD Project Manager
Alexis AQUILINA Project Manager

Remerciements

Je remercie tout particulièrement mon maître de stage, le Professeur Gerald WATTS, de m'avoir donné la chance d'effectuer mon stage d'ingénieur au sein de son équipe de recherche ; et pour m'avoir guidée et soutenue tout au long de cette année avec tant d'attention et la volonté permanente de me voir m'enrichir et m'accomplir pleinement.

Merci à Carla TARPAY et Helen THOMS pour toutes leurs démarches administratives concernant mon visa stagiaire.

Je tiens à remercier le Dr Dick CHAN, mon responsable de laboratoire, qui m'a écouté et accompagné tout au long de mes projets de recherche. Mes remerciements vont aussi au Professeur Hugh BARRETT, pour ses précieux conseils et son soutien.

Je remercie Jock Ian FOO et June JI pour leur aide dans l'accomplissement de mes travaux. Mes remerciements vont également à tous les doctorants et l'ensemble du personnel m'ayant accueillie chaleureusement au sein du *Medical Research Foundation* avec patience et gentillesse.

Un grand merci à Emilie MAS grâce à qui j'ai pu trouver mes marques et travailler en alliant sérieux et convivialité.

Toute ma gratitude à Lynda SOUTHWELL, infirmière de recherche sur le projet des microparticules, pour son écoute, ses recommandations et son assistance répétée.

Je tiens à remercier le Dr Jim THOM, responsable de l'unité de coagulation du département d'Hématologie de l'hôpital Royal de Perth, pour la collaboration que nous avons pu mener ensemble sur le projet des microparticules.

Un grand merci à Rom KRUEGER, responsable de la plateforme de cytométrie en flux de l'hôpital Royal de Perth, pour son soutien, ses conseils et le temps qu'il a consacré à me former dans une ambiance studieuse mais toujours chaleureuse.

Je tiens à témoigner ma sincère et profonde gratitude au Dr Joël MAZURIER et Dr Mathieu CARPENTIER d'avoir bien voulu évaluer ce mémoire en tant que rapporteurs et Dr Marie-Irène MALEWIAK d'avoir accepté de présider ce jury.

Merci à Geneviève CORDONNIER, à Zouher MAJD et Alexis AQUILINA qui m'ont aidé tout au long de mon parcours au CNAM et ont pris du temps pour relire ce mémoire.

Il aurait été difficile de travailler chaque jour sans la bonne humeur de toutes les personnes qui m'ont entouré pendant ce stage et pendant la rédaction de ce mémoire : un Grand Merci.

METABOLISME DES LIPOPROTEINES ET BIOMARQUEURS DANS LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES

Mémoire d'Ingénieur CNAM, Lille, Janvier 2012

RESUME

METABOLISME DES LIPOPROTEINES ET BIOMARQUEURS DANS LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES

Malgré les nombreux progrès réalisés en recherche médicale, les maladies cardiovasculaires constituent l'une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés. La découverte de nouveaux biomarqueurs est un enjeu majeur pour l'industrie pharmaceutique. Le premier projet dans ce mémoire d'ingénieur concerne la mesure des concentrations de pré-bêta HDL. Celui-ci a clairement démontré que les pré-bêta HDL sont très instables dans le plasma et que leur concentration est tributaire de l'utilisation d'un inhibiteur des enzymes LCAT et LPL. La deuxième étude implique la mesure des microparticules circulantes par cytométrie en flux chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale subissant un traitement LDL-aphérèse. Les résultats ont montré que l'aphérèse peut diminuer la concentration de microparticules totales dans le plasma. Le troisième projet concerne la mesure de la cinétique de la protéine CRP en utilisant la spectrométrie de masse chez des volontaires obèses avant et après la perte de poids. Dans cette étude, j'ai montré qu'il est possible de mesurer le turnover de la CRP dans le plasma à l'aide d'isotopes stables et de la spectrométrie de masse, les résultats suggèrent que la perte de poids diminue le rendement hépatique de la CRP. Collectivement, ces résultats se sont révélés informatifs, des travaux supplémentaires sont nécessaires.

Mots-clés : maladies cardiovasculaires, biomarqueurs, athérosclérose, microparticules, pré-bêta HDL, CRP.

ABSTRACT

LIPOPROTEINS METABOLISM AND BIOMARKERS IN CARDIOVASCULAR DISEASES

Despite the huge progress made in medicine, cardiovascular diseases remain one of the greatest causes of death in the industrialized world. The discovery of novel biomarkers to evaluate treatment's efficacy at the preclinical and clinical levels is a major stake for the pharmaceutical industry. The first project in this engineering memory involves the measurement of pre-beta HDL concentrations. This first study clearly demonstrated that pre-beta HDL is highly unstable in plasma and that its concentration is dependent on using inhibitor of the enzymes LCAT and LPL. The second concerns the measurement of plasma microparticles using flow cytometry in patients with familial hypercholesterolemia undergoing apheresis. The results have shown that apheresis can decrease total microparticle concentrations in plasma. The third project involves the measurement of CRP kinetics using mass spectrometry in obese volunteers before and after weight loss. In this study, I demonstrated that it is possible to measure the turnover of CRP in plasma using stable isotopes and mass spectrometry; the results suggest that weight loss decreases the hepatic output of CRP. Collectively, these results have proved informative, further work is required.

Keywords: cardiovascular diseases, biomarkers, atherosclerosis, microparticles, pre-beta HDL, CRP.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2D : Electrophorèse bidimensionnelle
ABCA1 : *Adenosine triphosphate-Binding Cassette transporter A1*
ABCG1, ABCG5, ABCG8 : *Adenosine triphosphate-Binding Cassette transporter G1, G5, G8*
Abciximab : (C7E3 Fab) Anticorps monoclonaux cardiovasculaire CD41 E3
Ac Mx : Anticorps Monoclonaux
ACAT : *Acyl Coenzyme A Cholestérol AcylTransferase*
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
Anti-GPIIbIIIa : Anti-glycoprotéines membranaires IIb-IIIa
apo : Apolipoprotéines
ARN : Acide RiboNucléique
°C : Degrés Celcius
CaCl₂ : Chlorure de calcium
CETP : *Cholesteryl Ester Transfer Protein*
CL : Cholestérol Libre
CRP : Protéine C Réactive
CV : Coefficient de Variation
Da : Dalton
ELISA : *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
FITC : Fluorescéine IsoThioCyanate
FSC : *Forward Scatter*
FT : Facteur Tissulaire
GPI : Glycosylphosphatidylinositol
H : heure
HCL : Acide Chloridique
HDL : *Hight Density Lipoprotein* / Lipoprotéine de haute densité
ICAM-1 : *Intra-Cellular Adhesion Molecule-1* / Molécule-1 d'adhésion intercellulaire
IDL : *Intermediary Density Lipoprotein* / Lipoprotéine de densité intermédiaire
IDM : Infarctus du Myocarde
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IMC : Indice de Masse Corporelle
iPLA 2 : *Calcium-independent Phospholipase A2* / Phospholipase A2 indépendante du calcium
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
LCAT : *Lecithin Cholesterol Acyl Transferase*
LDL : *Low Density Lipoprotein* / Lipoprotéine de basse densité
LDLox : LDL oxydées
LDL-R : *LDL-Receptor*
LH : Lipase Hépatique
LOX-1 : *Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor 1*
Lp (a) : Lipoprotéine (a)
LPL : *LipoProtein Lipase*
LRP : *LDL-R Related Protein*
MALDI-TOF : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight*
MCP-1 : *Monocyte Chemoattractant Protein-1* / Protéine chimiotactique-1 des monocytes
M-CSF : *Macrophage Colony Stimulating Factor* / Facteur de croissance hématopoïétique des macrophages

MERTK : *MER Receptor Tyrosine Kinase* / Récepteur tyrosine kinase transmembranaire
MHC : *Major Histocompatibility Complex* / Complexe majeur d'histocompatibilité
MMP : *Matrix Metalloproteinase* / metalloproteinase membranaire
MPs : Microparticules
MS : Mass
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate
NFκB : *Nuclear Factor kappaB* / Facteur nucléaire κB
NO : Monoxyde d'azote
PAF : *Platelet-Activating Factor* / Facteur d'activation plaquettaire
PAI-1 : *Plasminogen Activator Inhibitor-1* / Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PBS : *Phosphate Buffer Saline*
PC : Phosphatidylcholine
PE : Phosphatidyléthanolamine
PECAM-1 : *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* / Molécule-1 d'adhésion cellulaire plaquette – cellule endothéliale
PEIPC : 1-palmitoyl-2-époxyisoprostane-sn-glycéro-3-phosphorylcholine
PFP : *Platelet Free Plasma*
PGPC : 1-25-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycéro-3-phosphorylcholine
PL : Phospholipides
PLTP : *Phospholipid Transfer Protein*
PMF : Peptide Mass Fingerprinting
POVPC : 1-palmitoyl-2-oxovaléroyl-sn-glycéro-3-phosphorylcholine
PFP : *Platelet Free Plasma*
PS : Phosphatidylsérine
PTI : Purpura Thrombopénique Idiopathique
RANTES : *Regulated on Activation of Normal T cell Expressed and Secreted*
rpm : rotations par minute
SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SM : Sphingomyéline
SMCs : *Smooth Muscle Cells* / Cellules musculaires lisses
SR-B1 : *Scavenger Receptor-Type B1*
SSC : *Side Scatter*
TFA : Acide trifluoroacétique
TFAA : Acide trifluoroacétique anhydrique
TG : Triglycérides
TNF-α : *Tumor Necrosis Factor α*
TIM-4 : *T-cell Immunoglobulin and Mucin domain 4*
UV : UltraViolet
VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* / Molécule-1 d'adhésion cellulaire des vaisseaux
V : Volt
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor* / Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VLDL : *Very Low Density Lipoprotein* / Lipoprotéine de très basse densité
VLDL-R : *VLDL-Receptor*

TABLES DES MATIERES

Remerciements

Liste des Abréviations

Table des matières

A-	INTRODUCTION.....	1
B-	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I-	Métabolisme des lipides dans l'organisme.....	3
1.	Généralités sur les lipoprotéines.....	3
1.1	Structure des lipoprotéines.....	3
1.2	Les différentes classes de lipoprotéines humaines.....	3
1.3	Les apolipoprotéines humaines.....	5
1.4	Les récepteurs cellulaires des lipoprotéines humaines.....	5
1.5	Les enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines.....	5
2.	Métabolisme des lipoprotéines.....	6
2.1	Voie exogène : de l'intestin vers le foie.....	6
2.2	Voie endogène : du foie vers les tissus périphériques.....	7
2.3	Transport inverse du cholestérol : des tissus périphériques vers le foie.....	9
2.3.1	Formation des pré β -HDL.....	9
2.3.2	Efflux du cholestérol cellulaire.....	10
2.4	Elimination du cholestérol.....	12
3.	Les transporteurs.....	14
4.	Métabolisme détaillé des différentes particules HDL.....	14
4.1	Formation des particules pré β -HDL.....	15
4.2	Transformation des pré β -HDL en α -HDL.....	16
4.3	Transformation des particules α -HDL.....	17
4.3.1	Conversion des α -HDL petites en α -HDL larges.....	17
4.3.2	Conversion des α -HDL en pré β -HDL.....	18
II-	Pathologies associées à un déséquilibre de l'homéostasie du cholestérol.....	21
1.	L'athérosclérose.....	21
1.1	Localisation de l'athérosclérose.....	21
1.2	Etapas de formation de la plaque d'athérome.....	22
1.3	Les facteurs de risque.....	24
1.3.1	Facteurs non modifiables.....	24
1.3.2	Facteurs modifiables.....	25
2.	L'hypercholestérolémie familiale.....	29
2.1	Clinique.....	30
2.2	Génétique et physiopathologie.....	30
2.3	Traitement de l'hypercholestérolémie familiale.....	32
2.3.1	La prise en charge médicamenteuse : les moyens.....	32

	a- Statines.....	32
	b- Résines séquestrantes de cholestérol.....	33
	c- Dérivés des fibrates et de l'acide nicotinique.....	33
	d- Ezétimibe.....	34
	e- Autres molécules.....	34
	2.3.2 Conduite du traitement.....	34
	2.3.3 L'aphérèse des LDL.....	35
III-	La protéine C-réactive ou <i>C-reactive protein</i> (CRP).....	37
1.	Caractéristiques générales, origine et utilisation de la CRP.....	37
1.1	Historique.....	37
1.2	Structure.....	37
1.3	Synthèse.....	38
1.4	Cinétique.....	38
1.5	Méthodes de dosage.....	38
1.6	Variations cliniques.....	39
1.7	Rôle de la CRP.....	39
2.	La CRP, biomarqueur du risque indépendant de survenue de maladies cardiovasculaires.....	42
IV-	Les microparticules endothéliales et applications en recherche clinique.....	47
1.	L'endothélium vasculaire.....	47
1.1	Définition.....	47
1.2	Implication de l'endothélium dans les réponses inflammatoires et immunologiques.....	47
2.	Caractéristiques générales, origine et formation des microparticules (MPs)....	49
2.1	Composition des microparticules.....	50
2.1.1	Structure membranaire et translocation des lipides.....	50
2.2	Genèse des microparticules.....	53
2.2.1	Les stimuli de la production de microparticules.....	54
2.2.2	Phénomènes présidant à la « naissance » des microparticules.....	54
2.2.3	Des microparticules variables d'une « cellule mère » à l'autre.....	55
3.	Microparticules endothéliales, nouveaux marqueurs biologiques.....	57
C-	MESURE IN VITRO DE LA CONCENTRATION DES PRE-BETA HDL (Projet n°1).....	59
I-	Rationnel et objectif de l'étude sur la stabilité des pré β -HDL.....	59
II-	Matériel et Méthodes.....	59
1.	Protocole d'étude.....	59
2.	Matériel.....	60
3.	Echantillons.....	60
4.	Méthodes.....	61
4.1	L'électrophorèse.....	61
4.2	Immunoblot.....	61

4.2.1	Transfert passif des protéines.....	61
4.2.2	Fixation, blocage et immunodetection.....	61
4.2.3	Normalisation.....	62
III-	Résultats et Discussion.....	63
1.	Résultats.....	63
1.1	Localisation des pré β -HDL.....	63
1.2	Détection des pré β -HDL dans le plasma.....	64
1.3	Effets de la durée de stockage et de la température sur la quantité relative des pré β -HDL.....	65
1.4	Effets du DNTB sur la stabilité des pré β -HDL.....	66
2.	Discussion.....	67
D-	VERS UNE STANDARDISATION DE LA METHODE DE QUANTIFICATION DES MICROPARTICULES ADAPTEE EN RECHERCHE CLINIQUE.....	69
I-	Résultats.....	70
1.	Optimisation du prélèvement plasmatique pour la quantification des MPs....	70
1.1	Isolement et conservation du plasma des patients - Choix du type de tube de prélèvement.....	70
1.2	Comparaison entre prélèvements frais et congelés.....	70
1.3	Effet du délai entre prélèvement et sa congélation sur le dosage des microparticules.....	70
2.	Optimisation et standardisation de la fenêtre de détection des microparticules avec les billes Mégamix.....	71
3.	Mise au point du multimarquage et de la quantification en valeur absolue des microparticules.....	72
4.	Méthode retenue.....	75
II-	Commentaires et perspectives.....	75
E-	MESURE DES MICROPARTICULES CIRCULANTES PAR CYTOMETRIE EN FLUX CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS D'HYPERCHOLESTEROLEMIE FAMILIALE EN TRAITEMENT LDL-APHERESE (Projet n°2).....	77
I-	Rationnel et objectif de l'étude des microparticules endothéliales : biomarqueurs de l'athérosclérose au début de l'hypercholestérolémie familiale.....	77
II-	Matériel et Méthodes.....	78
1.	Patients et protocole de l'étude.....	78
2.	Prélèvement et traitement des échantillons.....	79
3.	Méthodes d'analyse.....	80
3.1	Analyse par cytométrie de flux.....	81
3.2	Analyse statistique.....	83
III-	Résultats et Discussion.....	84

F-	MESURE DE LA CINETIQUE DE LA C-REACTIVE PROTEINE (CRP) PAR SPECTROMETRIE DE MASSE CHEZ DES PATIENTS VOLONTAIRES OBESES AVANT ET APRES PERTE DE POIDS (Projet n°3).....	88
I-	Rationnel et objectif de l'étude de la cinétique de la CRP.....	88
	1. Principe d'une étude cinétique.....	88
	1.1 Marquage des lipoprotéines.....	88
	1.2 Administration du traceur dans le marquage endogène.....	89
	1.3 Modélisation mathématique.....	90
	2. Protocole de l'étude cinétique de la CRP.....	92
II-	Matériel et Méthodes.....	93
	1. Echantillons biologiques.....	93
	2. Principe de la mesure de la CRP.....	93
	3. Méthodes d'analyse.....	94
	3.1 Isolement de la CRP.....	94
	3.1.1 Couplage du ligand de la CRP.....	95
	3.1.2 Electrophorèse SDS-PAGE.....	95
	3.1.3 Transfert de la protéine CRP par western-blot.....	95
	3.2 Mesures de l'enrichissement isotopique.....	96
	3.2.1 Hydrolyse, dérivation et GCMS.....	96
III-	Résultats et Discussion.....	96
	1. Résultats.....	96
	2. Discussion.....	96
G-	CONCLUSIONS.....	100
H-	BIBLIOGRAPHIE.....	104
I-	ANNEXES.....	115

Liste des figures

Liste des tableaux

A- INTRODUCTION

Malgré les nombreux progrès réalisés en recherche médicale, les maladies cardiovasculaires constituent l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. Elles touchent plus de 100 millions de personnes dans le monde et les experts prévoient qu'elles causeront plus de 25 millions de décès en 2030, contre 17,5 millions en 2005. De plus, le développement de médicaments pour lutter contre ces troubles du métabolisme est devenu extrêmement difficile. Par conséquent, la découverte de nouveaux biomarqueurs pour prédire et évaluer rapidement l'efficacité et la toxicité de candidats médicaments aux niveaux préclinique et clinique devient un enjeu majeur pour l'industrie pharmaceutique. Actuellement, en pratique clinique quotidienne, dans le cadre de la prévention primaire cardio-vasculaire, le risque global d'un individu tout venant est estimé par des « modèles de risque ». Il s'agit de modèles mathématiques permettant une estimation de ce risque en fonction de paramètres dits « facteurs de risque », bien documentés pour leur rôle causal dans les maladies cardio-vasculaires d'origine athéromateuse. Le médecin peut déterminer ces paramètres pour chaque patient à partir de son rendez-vous, d'un examen clinique et d'une analyse de sang et/ou d'urine. Le score alors fourni permet de prédire l'éventuelle survenue d'une maladie cardio-vasculaire dans un laps de temps donné et/ou de classer schématiquement les patients dans trois catégories de risque cardio-vasculaire global : faible, intermédiaire ou haut. Néanmoins, les facteurs de risque traditionnels et les scores de risque multifactoriels restent insuffisants pour prédire avec exactitude, chez un individu donné, le risque d'événements cardio-vasculaires ultérieurs. En effet, ces modèles doivent être pondérés selon la population étudiée et ne peuvent s'appliquer en cas de pathologies annexes. Par ailleurs, si l'attitude à tenir face à un sujet dit à haut risque est maintenant mieux standardisée, elle l'est beaucoup moins en ce qui concerne les sujets à risque faible ou intermédiaire. Pour garantir aux patients une meilleure prise en charge médicale, de nombreuses équipes ont ainsi cherché à identifier des nouveaux biomarqueurs, mesures physiques ou biologiques, à même de mieux prédire la survenue des maladies cardiovasculaires et/ou d'affiner le modèle de calcul du risque cardiovasculaire global.

Parmi les enjeux de recherche fondamentale et clinique, plusieurs pistes sont aujourd'hui développées parmi lesquelles : identification de nouveaux gènes impliqués dans le métabolisme des HDL (lipoprotéines haute densité, transporteurs du "bon" cholestérol dans

le sang), la régulation épigénétique au cours de l'athérosclérose, le rôle fonctionnel des lymphocytes et des macrophages, la recherche de biomarqueurs précoces (protéique, leucocytaire, artériel), le phénotypage de patients à risque cardiométabolique élevé. Les travaux relatifs à la C réactive protéine ultrasensible (CRP_{us}), à la troponine (T), au peptide natriurétique de type B (BNP) et le NT-proBNP, à l'homocystéine ou la lipoprotéine(a) ont été, en partie, réalisés en ce sens. Cependant, leur utilisation en prévention primaire est, en définitive, quasi nulle. Ils n'ont, en effet, un intérêt diagnostique ou pronostique qu'au cours d'un événement ischémique (CRP_{us}, T, BNP et NT-proBNP) et/ou ne permettent pas d'améliorer le modèle de calcul du risque cardiovasculaire global en prévention primaire (homocystéine, lipoprotéine(a)). Aujourd'hui, plusieurs groupes de recherche s'intéressent à une nouvelle classe de biomarqueurs : les microparticules (MPs), structures micrométriques issues des membranes cellulaires, présentes dans divers fluides corporels. Elles sont détectées dans le sang d'individus indemnes de toute maladie, mais leur concentration s'élève notablement lors du déclin de nombreuses pathologies aiguës. On peut alors se demander si, dans le cas de pathologies évoluant à bas bruit, sur de nombreuses années, comme la maladie athéromateuse, certaines caractéristiques de ces MPs ne seraient pas directement corrélées au stade d'évolution de la maladie. Si cette hypothèse se vérifiait, on pourrait utiliser ce biomarqueur pour mieux stratifier le risque cardiovasculaire, préalable indispensable à la prise en charge des patients en prévention primaire des maladies cardiovasculaires.

C'est le processus nécessaire à la recherche et l'identification de ces biomarqueurs qui fera l'objet de ce mémoire. Ce mémoire d'ingénieur présente dans sa partie introductive la structure et le métabolisme des lipides (Chapitre I) dans l'organisme ainsi que les acteurs impliqués et les pathologies connues à ce jour, qui leur sont associées (Chapitre II) ; et en particulier des pré- β HDL qui joueraient le rôle d'accepteurs précoces du cholestérol en excès des membranes cellulaires. Le chapitre III est relatif à la c-réactive protéine (CRP), biomarqueur du risque indépendant de survenue de maladies cardiovasculaires. Enfin, le chapitre IV est un rappel bibliographique sur les microparticules endothéliales et leurs applications en recherche clinique. Les travaux détaillés s'intéressent dans un premier temps à la mesure *in vitro* des concentrations des pré- β HDL. Le deuxième projet entrepris est l'analyse des microparticules circulantes par cytométrie en flux chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, en traitement LDL-aphérèse. Le troisième projet concerne l'étude de la cinétique de la protéine CRP par spectrométrie de masse chez des patients volontaires obèses avant et après la perte de poids.

B- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. MÉTABOLISME DES LIPIDES DANS L'ORGANISME

Le cholestérol a deux origines, il est soit ingéré dans le bol alimentaire et absorbé au niveau de l'intestin, soit néo-synthétisé par les hépatocytes et les cellules périphériques. Sa seule voie de sortie de l'organisme se fait par l'excrétion hépatobiliaire car la majorité des tissus périphériques est incapable de le dégrader localement. Le foie est donc le principal organe de dégradation du cholestérol. A son niveau, le cholestérol peut être soit transformé en acide biliaire, soit être directement excrété dans la lumière de l'intestin.

Le cholestérol est le précurseur des hormones stéroïdiennes et il est donc utilisé par les organes ou tissus qui les synthétisent. On peut citer les glandes corticosurrénales qui sécrètent le cortisol ainsi que les testicules ou les ovaires qui sécrètent respectivement la testostérone et les œstrogènes.

Le cholestérol et les autres lipides (esters de cholestérol, triglycérides et phospholipides) ne sont pas hydrosolubles, ils sont par conséquent insolubles dans les milieux biologiques. De ce fait, le transport des lipides dans le plasma et la lymphe est assuré par des complexes macromoléculaires hydrosolubles composés de divers lipides et protéines : les lipoprotéines.

1. Généralités sur les lipoprotéines

1.1 Structure des lipoprotéines

Il existe plusieurs classes de lipoprotéines mais toutes ont une structure identique. Elles sont constituées :

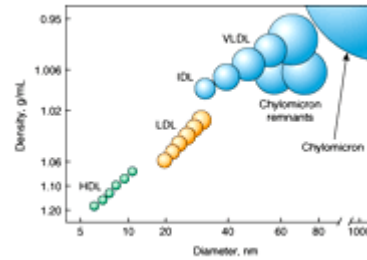
- D'un cœur hydrophobe contenant les esters de cholestérol (EC) et les triglycérides (TG),
- D'une monocouche externe amphiphile composée de phospholipides (PL), de cholestérol libre (CL) et d'apolipoprotéines (apo).

1.2 Les différentes classes de lipoprotéines humaines

Il existe plusieurs classes de lipoprotéines :

- Les chylomicrons (CM),
- Les lipoprotéines de très basse densité (VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*),
- Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL : *Intermediary Density Lipoprotein*),
- Les lipoprotéines de basse densité (LDL : *Low Density Lipoprotein*),
- Les lipoprotéines de haute densité (HDL : *High Density Lipoprotein*),
- Il existe également une autre sorte de lipoprotéines, la Lp (a), composée d'une molécule d'apolipoprotéine (a) reliée par un pont disulfure à une molécule d'apo B100.

Figure 1 : La distribution en fonction de la taille et de la densité des principales classes de lipoprotéines humaines. (D'après Harrison's Principles of Internal Medicine, 18e édition, Dan L. Longo, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo, Eds.,2008)



Ces lipoprotéines diffèrent par leur densité, leur taille, leur contenu en apolipoprotéines ainsi que par la composition lipidique de leur cœur hydrophobe (rapport EC/TG variable). Ces particules peuvent ainsi être classées en fonction de :

- Leur contenu lipidique : les chylomicrons et les VLDL contiennent principalement des triglycérides alors que les IDL, LDL et HDL véhiculent essentiellement des esters de cholestérol,
- Leur composition en apolipoprotéines :
 - Les lipoprotéines à apo B, (chylomicrons, VLDL, IDL et LDL) se distinguent des HDL qui ne contiennent pas d'apo B,
 - Les lipoprotéines à apo A que sont les HDL qui peuvent être séparées en différentes sous-populations selon le type d'apo A qui les compose : les HDL contenant l'apo AI seule (LpAI), l'apo AII seule (LpAII) qui est seulement présente chez les alcooliques, l'apo AI et l'apo AII (LpAI/AII), l'apo AIV (LpAIV) toujours associée à l'apo AI (LpAI/AIV) (Alaupovic *et al.*, 2003 ; Duriez et Fruchart, 1999).

Tableau 1. Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines.

TYPE DE LIPOPROTÉINE	MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE	DENSITÉ (g/ml)	TAILLE (nm)	PROPORTION EC/TG	PRINCIPALES APOLIPOPROTÉINES (APO)
Chylo-microns	Pas de migration	0,93	75-1 200	1/19	B48, E, C
VLDL	préβ	0,93-1,006	30-80	1/3,3	B100, E, C
IDL	préβ lent	1,006-1,019	27-5	1/3,5	B100, E
LDL	β	1,019-1,063	18-27	1/0,23	B100
HDL2	α	1,063-1,125	9-12	1/0,22	AI, AII, C
HDL3	α	1,125-1,210	7-9	1/0,19	AI, AII, C
préβHDL	préβ	1,210-1,250	<7 (disques)	nd	AI
Lp(a)		1,040-1,115	25		B100, (a)

IDL : *Intermediate Density Lipoprotein* ; EC : esters de cholestérol ; TG : Triglycérides ; nd : non-déTECTABLE. (adapté de Voet et al., 2005 et Murray et al., 2000)

1.3 Les apolipoprotéines humaines

Les apolipoprotéines (fraction protéique des lipoprotéines) jouent un rôle important dans la structure et la stabilité des lipoprotéines. Leur fonction majeure est de favoriser le transport des lipides dans les compartiments intravasculaires et extravasculaires. Elles sont également responsables des propriétés fonctionnelles des lipoprotéines ainsi que de leur devenir métabolique. En effet, ces protéines sont impliquées dans la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines, dans la régulation (activation ou inhibition) d'enzymes responsables du métabolisme des lipoprotéines (par exemple l'apo A1 est l'activateur physiologique de l'enzyme LCAT (*Lecithin Cholesterol Acyl Transferase*)), et dans la liaison des lipoprotéines à leurs récepteurs cellulaires qui permet leur captation par les cellules (par exemple l'apo C1 est inhibitrice de la liaison des LDL à ses récepteurs). La liaison de la lipoprotéine à son récepteur s'effectue par l'intermédiaire de l'apo E pour les VLDL, de l'apo B100 pour les IDL/LDL et de l'apo AI pour les HDL. Jusqu'à présent, un nombre important d'apolipoprotéines a été identifié et caractérisé et leurs combinaisons au sein des lipoprotéines définissent les différentes sous-populations de lipoprotéines.

1.4 Les récepteurs cellulaires des lipoprotéines humaines

Tout au long de leur séjour dans le compartiment intravasculaire, les lipoprotéines peuvent être retirées de la circulation par des récepteurs cellulaires spécifiques au niveau du foie et des tissus périphériques (Hussain *et al.*, 1999). Deux familles de récepteurs sont principalement responsables de la captation des lipides par les cellules : celle des récepteurs aux LDL (LDL R (*LDL-Receptor*), LRP (*LDL-R Related Protein*) et VLDL-R (*VLDL-Receptor*)) et celle des récepteurs *scavenger* (« éboueurs »). Alors que la captation des lipoprotéines par les récepteurs aux LDL s'effectue par un mécanisme d'endocytose, le récepteur *scavenger* SR-B1 (*Scavenger Receptor-Type B1*) est capable de capter sélectivement les esters de cholestérol contenus dans les lipoprotéines, sans internalisation de la particule (Acton *et al.*, 1996). La captation, sélective ou non, des esters de cholestérol assure un approvisionnement en cholestérol des cellules des tissus périphériques. En revanche, la captation du cholestérol via le LDL-R par les hépatocytes permet son élimination sous forme d'acides biliaires, le foie étant le principal organe capable de cataboliser le cholestérol.

1.5 Les enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines

Au cours de leur passage dans le compartiment intravasculaire, les lipoprotéines subissent des remaniements par différentes enzymes plasmatiques localisées au niveau de l'endothélium vasculaire ou des HDL circulantes : LCAT, CETP (*Cholesteryl Ester Transfer Protein*), de la LH (Lipase Hépatique) et LPL (*LipoProtein Lipase*).

2. Métabolisme des lipoprotéines

Le métabolisme des lipoprotéines au sein du compartiment vasculaire s'effectue selon deux voies opposées :

- La voie d'apport des lipides : elle implique les lipoprotéines à apo B et permet le transport des lipides alimentaires de l'intestin vers le foie par les chylomicrons (voie entéro-hépatique exogène), puis du foie vers les tissus périphériques par les VLDL, IDL et LDL (voie endogène potentiellement athérogène),
- La voie de retour des lipides : elle est assurée par les HDL qui ramènent les lipides des tissus périphériques vers le foie permettant ainsi l'élimination du cholestérol sous forme native ou après transformation en acides biliaires (voie anti-athérogène).

2.1 Voie exogène : de l'intestin vers le foie

Les lipides alimentaires, principalement constitués de cholestérol et d'acides gras, forment des micelles au niveau de la lumière de l'intestin. Celles-ci sont absorbées par les entérocytes de la muqueuse intestinale (internalisation). Une fois internalisé, le cholestérol est transformé en esters de cholestérol par l'enzyme ACAT (*Acyl Coenzyme A : Cholesterol AcylTransferase*) localisée dans le réticulum endoplasmique des cellules de la paroi intestinale (Norum *et al.*, 1983). Les esters de cholestérol et les triglycérides sont ensuite incorporés dans les chylomicrons que synthétisent les entérocytes. Ces derniers sont sécrétés dans la lymphe puis rejoignent la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière gauche. L'apo B48, forme tronquée de l'apo B100 (correspondant aux 48% de la partie N-terminale de celle-ci), est nécessaire à l'assemblage des chylomicrons (Anant et Davidson, 2001). En phase postprandiale, la synthèse et la sécrétion des chylomicrons sont directement liées à la quantité de lipides absorbés (Norum *et al.*, 1983).

Au cours de leur transit, les chylomicrons vont rapidement acquérir des apo C et apo E provenant des HDL. L'acquisition de ces apolipoprotéines est une étape essentielle du métabolisme des chylomicrons. En effet, lorsque les chylomicrons se lient à la LPL, enzyme

lipolytique ancrée dans l'endothélium vasculaire, l'apo CII, activateur de cette enzyme, va permettre l'hydrolyse des triglycérides en acides gras non estérifiés qui sont alors captés par les tissus périphériques pour y être stockés (tissu adipeux) ou métabolisés (muscles striés, coeur et cerveau). De plus, l'apo CII retarde l'élimination des chylomicrons de la circulation sanguine en diminuant leur liaison aux récepteurs des LDL (Clavey *et al.*, 1995 ; Quarfordt *et al.*, 1982). En revanche, l'apo CIII est inhibitrice de l'activité LPL (Clavey *et al.*, 1995 ; Mann *et al.*, 1997). Le rapport apo CII/CIII des chylomicrons est donc un facteur déterminant de l'activité LPL.

Sous l'action de la LPL, les chylomicrons perdent la majeure partie de leurs triglycérides et une partie de leurs composés de surface devenus excédentaires (phospholipides, cholestérol libre, apo AI et apo CII). Les lipoprotéines résultantes, plus petites, sont alors qualifiées de particules résiduelles ou « remnants » de chylomicrons. Elles sont captées soit par les tissus périphériques, principalement le tissu adipeux, le coeur et le muscle squelettique, soit par le foie. L'endocytose de ces remnants de chylomicrons s'effectue via l'apo E, ligand de plusieurs récepteurs cellulaires des lipoprotéines.

Après endocytose, les remnants de chylomicrons fusionnent avec les lysosomes. Cette association provoque une dégradation quasi complète de ces particules et l'hydrolyse des esters de cholestérol. Le cholestérol libre ainsi formé est alors incorporé dans de nouvelles lipoprotéines synthétisées par le foie, les VLDL, ou il est éliminé par la voie des acides biliaires, soit directement, soit sous forme d'acides biliaires (acide cholique, acide chénodésoxycholique). Les sels biliaires sont ensuite excrétés dans la lumière de l'intestin grêle puis réabsorbés en grande majorité au niveau de l'iléon ; ils rejoignent alors la circulation porte avant d'être capturés par le foie et ré excrétés dans la bile. Le cholestérol excrété avec les sels biliaires suit le même chemin. C'est ce que l'on appelle la voie entéro-hépatique endogène.

2.2 Voie endogène : du foie vers les tissus périphériques

Après endocytose des chylomicrons par le foie, et en dehors des périodes post-prandiales, la voie endogène d'apport des lipides prend le relais de la voie exogène et elle assure le transport des lipides du foie vers les tissus périphériques.

Dans les hépatocytes, le cholestérol libre est transformé en esters de cholestérol par l'ACAT.

Ces esters de cholestérol ainsi que les triglycérides hépatiques qui proviennent en majeure partie de l'estérification des acides gras libres plasmatiques (Gotto *et al.*, 1986), sont ensuite

incorporés dans les VLDL nouvellement synthétisées par le foie. L'apo B100, équivalent de l'apo B48 des chylomicrons, est nécessaire à l'assemblage des VLDL (Anant et Davidson, 2001). Chez l'homme, les VLDL ne contiennent que de l'apo B100, alors que chez les rongeurs, elles possèdent également l'apo B48 (Greeve *et al.*, 1993). Les VLDL sécrétées par les hépatocytes contiennent également des apo C et apo E, principalement néo-synthétisées par le foie.

Après leur sécrétion dans la circulation sanguine, les VLDL sont remodelées sous l'action de la LPL pour donner naissance à une nouvelle classe de lipoprotéines : les IDL. Sous l'action conjointe de la LH et de la CETP, une partie de ces IDL est transformée en LDL, particules enrichies en esters de cholestérol. Cet enrichissement résulte d'une part de l'appauvrissement du cœur hydrophobe en triglycérides suite à l'action des enzymes lipolytiques (LPL et LH), et d'autre part du transfert d'esters de cholestérol des HDL vers les LDL, étape réalisée par la CETP. Il faut toutefois noter que chez les espèces possédant une faible activité CETP ou totalement déficientes en CETP (rat et souris), les esters de cholestérol contenus dans les VLDL puis dans les IDL et LDL proviennent uniquement de l'action de l'ACAT hépatique. En revanche, chez les espèces présentant une forte activité CETP (homme et lapin), les VLDL, IDL et LDL acquièrent, sous l'action de la CETP, des esters de cholestérol issus de l'estérification par la LCAT du cholestérol contenu dans les HDL.

Les LDL forment une population hétérogène. Cette hétérogénéité serait due à l'existence en amont de deux sous-populations de VLDL synthétisées par le foie : les VLDL 1 grosses particules enrichies en triglycérides (330 à 700 Å), et les VLDL 2 plus petites, enrichies en esters de cholestérol (300 à 330 Å). Les VLDL 1 donneraient naissance aux LDL III petites et denses et les VLDL 2 aux LDL I et LDL II plus grosses et plus légères (Packard et Shepherd, 1997). Il a été démontré que les LDL III ou *small dense LDL*, corrélées positivement avec le risque cardiovasculaire, ont un temps de demi-vie dans le compartiment intravasculaire plus important que celui des LDL I et LDL II (Teng *et al.*, 1986). Cette augmentation du temps de résidence dans le plasma favorise l'oxydation des LDL. Ces LDL oxydées, non reconnues par le LDL-R, sont internalisées dans les macrophages via leur récepteur « éboueur » de classe A (*Scavenger Receptor – class A*). Cette captation n'étant pas régulée (Platt et Gordon, 2001), les macrophages se gorgent de lipides et se transforment en cellules spumeuses, première étape de la formation de la plaque d'athérome. Ces LDL III ont donc un fort potentiel athérogène.

Au cours de leur transit dans le compartiment intravasculaire, les particules à apo B (VLDL, IDL et LDL) peuvent être retirées de la circulation sanguine en se liant à des récepteurs spécifiques situés au niveau des tissus périphériques et du foie. Après endocytose par les cellules, les lipoprotéines sont dégradées dans les lysosomes assurant ainsi l'approvisionnement des cellules en cholestérol. Le cholestérol libre ainsi généré va participer à sa propre homéostasie intracellulaire (Brown et Goldstein, 1986):

- En inhibant l'activité de l'HMG-CoA réductase (Hydroxy-3-méthyl glutaryl coenzyme A), enzyme limitante de la synthèse endogène du cholestérol,
- En augmentant l'activité de l'ACAT qui va permettre le stockage du cholestérol sous forme d'esters de cholestérol,
- En réprimant l'expression des récepteurs aux LDL, bloquant ainsi la captation d'autres molécules de cholestérol par les cellules.

Les esters de cholestérol peuvent également être captés sélectivement par les cellules, à partir des lipoprotéines qui se lient au récepteur SR-B1, sans internalisation de la particule lipoprotéique (Acton *et al.*, 1996).

2.3 Transport inverse du cholestérol : des tissus périphériques vers le foie

Le foie constitue le principal organe capable de métaboliser le cholestérol excédentaire et de l'éliminer de l'organisme par voie biliaire sous forme native ou après transformation en acides biliaires. Cette voie d'élimination nécessite donc que le cholestérol excédentaire soit ramené des tissus périphériques vers le foie. Cette voie, appelée voie de retour ou transport inverse du cholestérol, est assurée par les HDL.

Les HDL constituent une classe de lipoprotéines très hétérogènes, elles sont qualifiées de particules anti-athérogènes. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence une corrélation négative entre le taux plasmatique de HDL cholestérol (surtout HDL2) et l'incidence des maladies cardiovasculaires (Miller et Miller, 1975a ; Miller et Miller, 1975b). Cette protection par les HDL est attribuée d'une part à leur rôle dans l'élimination du cholestérol excédentaire (elles ramènent celui-ci des tissus périphériques vers le foie), et d'autre part à leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques et profibrinolytiques (Calabresi *et al.*, 2003 ; Van Lenten *et al.*, 2001 ; Viles-Gonzalez *et al.*, 2003).

2.3.1 Formation des pré β -HDL : accepteurs précoces du cholestérol en excès des membranes cellulaires

Les acteurs initiaux de la voie de retour du cholestérol sont les pré β -HDL constituées d'une apolipoprotéine libre associée à quelques molécules de phospholipides et de cholestérol libre. Les particules naissantes pré β -HDL sont discoïdales et ont, comme leur nom l'indique, une migration pré β sur un gel d'agarose. Leur maturation conduit à la synthèse de particules α -HDL. L'origine métabolique des HDL naissantes est incertaine. Des études ont mis en évidence le rôle majeur du foie dans la formation des pré β -HDL, via des récepteurs hépatiques appelés ABCA1 (*Adenosine triphosphate-Binding Cassette transporter A1*). En effet, la surexpression ou l'invalidation du gène de l'ABCA1 au niveau du foie entraîne respectivement une augmentation ou une diminution du HDL cholestérol (Lee et Parks, 2005 ; Timmins *et al.*, 2005). Les pré β -HDL peuvent également être générées au cours du métabolisme des lipoprotéines qui sont soumises au cours de leur transit à des remaniements permanents. Ainsi, la LPL, en hydrolysant les triglycérides des chylomicrons et des VLDL, diminue la taille du cœur hydrophobe de ces particules. Les composés de surface, devenus excédentaires et libérés dans le compartiment intravasculaire, forment les pré β -HDL (Schaefer *et al.*, 1982) ou enrichissent les α -HDL pour augmenter leur taille (Rye et Barter, 2004). Enfin, les pré β -HDL peuvent provenir du remodelage intravasculaire des α -HDL (Barrans *et al.*, 1994 ; Barter *et al.*, 1990 ; Ellsworth *et al.*, 1987 ; Hopkins *et al.*, 1985 ; Kunitake *et al.*, 1992 ; Lagrost *et al.*, 1996).

2.3.2 Efflux du cholestérol cellulaire

Bien qu'étant quantitativement peu importantes par rapport aux α -HDL, les pré β -HDL sont considérées comme étant les accepteurs « préférentiels » du cholestérol cellulaire. L'efflux de cholestérol cellulaire vers les HDL s'effectue selon différents mécanismes :

- Par diffusion passive du cholestérol de la membrane plasmique vers le milieu extracellulaire, celui-ci étant intégré ensuite à la surface des lipoprotéines circulantes. Ce transfert dépend du gradient de concentration en cholestérol existant entre la membrane cellulaire et le compartiment intravasculaire (Rothblat *et al.*, 1986 ; Yancey *et al.*, 2003),
- Par l'action de l'enzyme CETP qui favorise *in vitro* l'efflux de cholestérol à partir de certains types cellulaires (Young et Brecher, 1981),
- Par le récepteur SR-B1 qui est responsable d'un mouvement bidirectionnel de cholestérol au niveau de la paroi cellulaire. Ce dernier mécanisme dépend d'une part du

gradient de cholestérol existant entre la membrane plasmique et la surface des HDL (de La Llera-Moya *et al.*, 2001 ; Yancey *et al.*, 2003) et d'autre part de la composition et du contenu en phospholipides des HDL (Yancey *et al.*, 2000). Ces différents mécanismes ont été décrits *in vitro* et les mécanismes mis en jeu *in vivo* restent inconnus. SR-B1 jouerait un rôle dans l'efflux de cholestérol par diffusion facilitée en favorisant la libération du cholestérol de la membrane plasmique et/ou en favorisant l'interaction de la lipoprotéine acceptrice avec la membrane cellulaire (Krieger, 2001 ; Rothblat *et al.*, 1999 ; Williams *et al.*, 1999),

- Par l'intermédiaire du récepteur ABCA1 qui facilite la translocation du cholestérol intracellulaire vers la membrane plasmique. En effet, des anomalies dans le gène codant pour cette protéine (maladie de Tangier entre autres) provoquent une diminution drastique du taux de HDL (Asztalos *et al.*, 2005 ; Hayden *et al.*, 2000 ; Timmins *et al.*, 2005). A l'inverse, des souris surexprimant le gène codant pour ABCA1 ont une augmentation marquée du cholestérol total et du HDL cholestérol (Brewer *et al.*, 2004 ; Lee et Parks, 2005 ; Vaisman *et al.*, 2001),

- Par l'intermédiaire du récepteur ABCG1 (*Adenosine triphosphate-Binding Cassette transporter G1*) qui est directement impliqué dans l'efflux du cholestérol de plusieurs tissus vers les HDL (Kennedy *et al.*, 2005 ; Klucken *et al.*, 2000 ; Nakamura *et al.*, 2004a ; Shachter, 2005). En effet, l'engorgement de macrophages avec du cholestérol provenant de LDL modifiées induit fortement l'expression du gène codant pour ABCG1, au contraire l'efflux du cholestérol supprime complètement son expression (Klucken *et al.*, 2000). *In vivo*, des souris invalidées ou transgéniques pour le gène codant pour ABCG1 présentent respectivement une accumulation ou une diminution de la quantité de lipides au niveau de la plèvre et du foie (Kennedy *et al.*, 2005). Contrairement à ABCA1, ABCG1 transfère le cholestérol aux HDL2 et HDL3 mais pas aux pré β -HDL (Wang *et al.*, 2004). Ainsi, ABCA1 et ABCG1 contribuent ensemble au transport du cholestérol excédentaire (Vaughan et Oram, 2005).

Les pré β -HDL discoïdales, dépourvues de cœur lipidique, se transforment en α -HDL sphériques contenant un noyau hydrophobe sous l'action de la LCAT dont le principal activateur est l'apo AI (Jonas, 2000). Cette enzyme, synthétisée par le foie et localisée à la surface des HDL, transestérifie le cholestérol libre de surface en esters de cholestérol qui migrent vers le cœur hydrophobe de la particule (Jonas, 2000). La transestérification du cholestérol assure ainsi le mouvement monodirectionnel du cholestérol des tissus périphériques vers les HDL. De même, il y a un enrichissement de pré β -HDL grâce à la PLTP (*PhosphoLipid Transfer Protein*).

Dans les α -HDL, les esters de cholestérol ont deux voies métaboliques possibles :

- Soit ils restent dans les particules α -HDL jusqu'à leur captation par les tissus (principalement le foie pour leur recyclage et les tissus stéroïdogènes pour la production d'hormones stéroïdiennes) via SR-B1,
- Soit ils sont transférés par la CETP vers les lipoprotéines à apo B en échange de triglycérides. Dès lors, les esters de cholestérol seront de nouveau redirigés vers les tissus périphériques ou captés par le foie en vue de leur recyclage.

2.4 Elimination du cholestérol

Dans le foie et les tissus stéroïdogènes, les esters de cholestérol contenus dans les HDL sont principalement éliminés par leur captation sélective via SR-B1 (Williams *et al.*, 1999). Des études récentes ont démontré que la captation sélective, par les cellules, des esters de cholestérol de particules HDL2 via SR-B1 entraîne l'apparition de remnants de HDL ayant une migration α (Webb *et al.*, 2002 ; Webb *et al.*, 2004). Il semblerait que ces remnants de HDL, différents des pré β -HDL, s'incorporent exclusivement dans des α HDL pré-existantes pour former des particules plus larges. Ce mécanisme ne requiert apparemment pas l'intervention des enzymes impliquées dans le remodelage intravasculaire des lipoprotéines (CETP, PLTP et LCAT). Les auteurs suggèrent que cette réassociation des remnants de HDL avec des HDL pré-existantes permet de retenir les apolipoprotéines des HDL dans la circulation après la captation sélective de leurs esters de cholestérol via SR-B1 (Webb *et al.*, 2004).

L'entrée des esters de cholestérol dans le foie constitue l'étape ultime de la voie de retour du cholestérol. La sécrétion biliaire représente la voie majoritaire d'élimination du cholestérol de l'organisme à laquelle participent toutes les classes de lipoprotéines (à noter que le cholestérol peut également être stocké dans le foie sous forme d'esters de cholestérol et non systématiquement remis en circulation). Deux voies distinctes participeraient à la formation de la bile (Carey, 1997 ; Cohen, 1999 ; Schwartz *et al.*, 1978a ; Schwartz *et al.*, 1978b) :

- Une voie extra-lysosomale : le cholestérol provenant des HDL est acheminé directement vers les canalicules biliaires et ceci constitue la source principale de cholestérol biliaire. Une voie intra-lysosomale : le cholestérol provenant de l'endocytose des VLDL et LDL sert à l'élaboration des sels biliaires.

Les deux tiers du cholestérol retrouvé dans la bile sous forme libre ou de sels biliaires proviennent des lipoprotéines plasmatiques. Le reste est issu de la synthèse *de novo* de cholestérol par le foie (Schwartz *et al.*, 1978b).

Les deux enzymes hépatiques majeures de la synthèse des acides biliaires sont la cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) et la cholestérol 27-hydroxylase (CYP27A1) appelée aussi la 26-hydroxylase. La CYP7A1 transforme le cholestérol en 7 α cholestérol qui est la première étape dans la synthèse des acides biliaires, il s'agit de l'étape limitante de la biosynthèse des acides biliaires. La CYP27A1 produit du 27-hydroxycholestérol soit au niveau du foie soit au niveau des tissus extrahépatiques (en particulier le poumon), le 27-hydroxycholestérol est dans ce cas transporté ensuite vers le foie pour y être dégradé en acides biliaires.

L'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique sont les deux acides biliaires primaires les plus abondants qui sont synthétisés par le foie à partir du 7 α -hydroxycholestérol en plusieurs étapes. Ces acides biliaires primaires (cholique et chénodésoxycholique), issus de la voie de formation des acides biliaires, sont conjugués dans le foie avec le glycocole ou la taurine pour constituer les sels biliaires primaires : glycocholate, glycochénodésoxycholate, taurocholate et taurochénodésoxycholate. Ces sels sont excrétés dans la bile vers l'intestin par la pompe BSEP (*Bile Salts Export Pump*) (Nathanson *et al.*, 1991). Les sels biliaires sont des cofacteurs indispensables à l'action de la lipase pancréatique au cours de la digestion des lipides dans le duodénum et le jéjunum. Dans l'iléon, sous l'action des bactéries intestinales, les sels biliaires sont déconjugués. L'acide cholique est partiellement transformé en acide désoxycholique, et l'acide chénodésoxycholique en acide lithocholique. L'acide désoxycholique et l'acide lithocholique sont les acides biliaires secondaires.

Les acides biliaires primaires et secondaires sont réabsorbés dans l'iléon par le co-transporteur spécifique d'acides biliaires sodium-dépendant ISBP (*Ileal Sodium-dependant Bile salts Transporter*) et transportés par la veine porte vers le foie (Wong MH *et al.*, 1995). Tous les acides biliaires sont recaptés par le foie par le transporteur NTCP (*Natrium Taurocholate Cotransporting Polypeptide*) et sont reconjugués comme les acides biliaires primaires, sauf l'acide lithocholique qui est sulfoconjugué (Hagenbuch B *et al.*, 1994). Les sels biliaires primaires et secondaires sont alors excrétés de nouveau dans la bile : cette voie métabolique est le cycle entéro-hépatique des sels biliaires. Une partie des acides biliaires primaires et secondaires déconjugués est également excrétée dans les fèces (environ 600 mg/24h) (Podevin *et al.*, 1999). Le sulfolithocholate n'est, quant à lui, ni déconjugué ni réabsorbé ; il est donc obligatoirement excrété.

Les acides biliaires sont donc les produits du catabolisme du cholestérol. Le cholestérol lui-même et les acides biliaires sont excrétés dans la bile vers l'intestin. Tous sont fortement réabsorbés mais une petite partie est éliminée dans les fèces en quantité aussi importante que l'apport de cholestérol alimentaire et endogène, ce qui permet de maintenir la quantité de cholestérol de l'organisme.

3. Les transporteurs

Les transporteurs du cholestérol (ABCA1, ABCG5, ABCG8, SR-B1...) agissent principalement à deux niveaux :

- Au niveau de l'intestin (ABCA-1, ABCG-5, ABCG-8) lors de l'absorption du cholestérol et de son rejet dans la lumière intestinale,
- Au niveau des cellules périphériques (ABCA-1, ABCG-1, SRB-1) en jouant un rôle lors de l'excrétion du cholestérol de celles-ci vers les HDL.

Nous avons vu précédemment que l'efflux de cholestérol est essentiellement médié par les transporteurs du cholestérol. Ainsi, des anomalies sur les gènes codant pour les protéines impliquées dans l'efflux du cholestérol sont à l'origine de déficits sévères en HDL et de dyslipidémies. Il a été montré que les patients souffrant de la maladie de Tangier possèdent une mutation sur leurs deux allèles du gène codant pour ABCA1. Il s'agit d'une maladie extrêmement rare, touchant une à deux dizaines de familles recensées à travers le monde. Cette maladie est caractérisée par l'apparition d'opacités cornéennes, une augmentation du volume des amygdales caractéristiques par leur couleur orangée et une athérosclérose disséminée. Le foie et la rate peuvent augmenter de volume et des dépôts de cholestérol peuvent être également observés sur la muqueuse du rectum. L'accumulation disséminée de cholestérol dans les organes contraste avec l'absence de HDL et d'apo A1 dans le plasma.

4. Métabolisme détaillé des différentes particules HDL

Les particules HDL ont été initialement définies par leur densité hydrique, située entre 1,063 et 1,21 g/ml. Leur analyse ultérieure a montré une hétérogénéité considérable quant à leur taille et à leur composition (Tall et Small, 1978 ; Eisenberg *et al.*, 1984). Globalement, les protéines représentent environ 50 % de leur poids et sont constituées essentiellement de l'apo A1 et de l'apo A2 ; nombre d'autres constituants protéiques mineurs (apo AIV, AV, CI, CII, CIII, D, E et SAA) étant également présents à leur surface. L'autre partie des HDL est constituée de phospholipides, de cholestérol et d'une faible quantité de triglycérides. Ces

moyennes recouvrent en réalité une très grande hétérogénéité, mise en évidence depuis de nombreuses années (). Cette hétérogénéité peut être observée en utilisant les propriétés physicochimiques des différentes particules situées dans l'intervalle de densité des HDL. Les propriétés principales utilisées pour distinguer les différentes fractions de HDL sont la taille et la charge électrique. La nomenclature concernant la charge électrique est calquée sur la migration des protéines plasmatiques en électrophorèse. La majorité des HDL a une charge de type α , une forme sphérique et une taille située entre 9,5 et 17 nm, mais une fraction des HDL a une migration de type pré-bêta (pré- β) et une taille très variable, soit faible, de 4 à 7 nm, soit plus importante, de 10 à 12 nm. Il existe également une fraction dont la migration est de type pré-alpha (pré- α). Les fractions de HDL sont ainsi définies par les critères de taille et de charge électrique, et l'application pratique consécutive de ces deux critères a permis de définir plusieurs sous-fractions (figure 2). Les pré- β -HDL sont subdivisées en sous-fractions pré- β 1-HDL et pré- β 2-HDL, tandis que les pré- α -HDL sont subdivisées en pré- α 1- et pré- α 4-HDL. Cette classification a permis d'analyser de façon approfondie la transformation métabolique d'une fraction de HDL en une autre, et de définir les mécanismes de cette transformation en fonction des différents acteurs métaboliques (récepteurs, enzymes plasmatiques) impliqués.

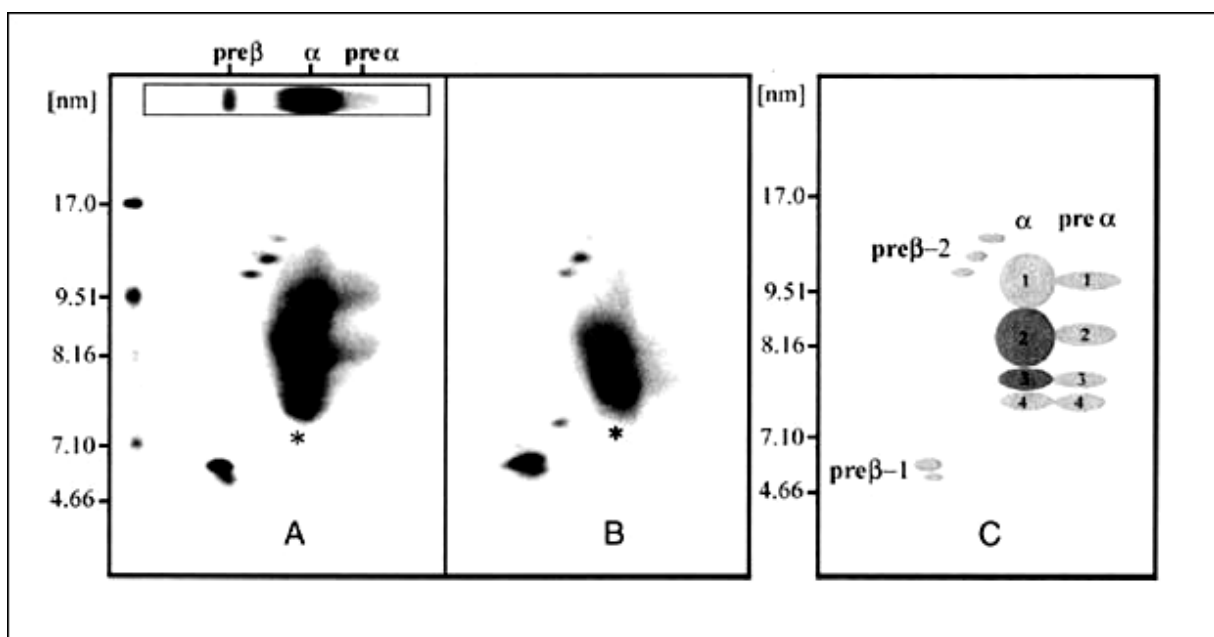


Figure 2 : Séparation des souspopulations de HDL par électrophorèse en deux dimensions.

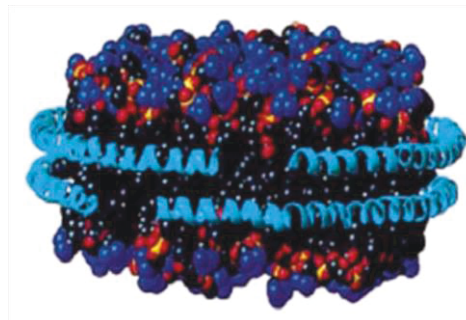
Fractions des HDL séparées en fonction de leur charge électrique et de leur taille. Le plasma est déposé et les composants migrent dans un champ électrique. Puis les composants ainsi séparés sont déposés sur un gel non dénaturant permettant de les séparer en fonction de leur taille. Le contenu en apo AI et en apo AII est révélé par des anticorps spécifiques. (adaptée de Schafer and Asztalos., *Am J Cardiol.* (2007))

4.1 Formation des particules pré β -HDL

L'apo A1 est excrétée libre ou liée à quelques molécules de phospholipides. La liaison de quelques molécules de phospholipides à une molécule d'apo A1 se réalise par interaction, soit au sein du réticulum endoplasmique, soit avec des micro-domaines spécifiques des membranes cellulaires situés à la surface de la cellule. L'observation selon laquelle l'apo A1 pouvait capter des phospholipides à l'intérieur de la cellule au cours d'un phénomène de rétro-endocytose est à l'origine de la description du premier mécanisme de formation des particules pré β -HDL (). Les particules résultant de l'interaction de l'apo A1 et de quelques molécules de phospholipides constituent des particules appelées pré- β 1-HDL, qui ont la forme de petits disques constitués d'une couche bilamellaire de phospholipides associée à une molécule d'apo A1. Les particules pré- β 1-HDL peuvent être sécrétées, par les hépatocytes et les macrophages, indirectement suite à la digestion de chylomicrons qui libèrent des particules de PL riches en apoA1 : les pré β -HDL ; mais non par d'autres cellules comme les entérocytes, la majorité de ces particules ayant une origine hépatique. L'expression du récepteur ABCA1 n'est pas nécessaire à la formation des particules pré- β 1-HDL (). Ces particules pré- β 1-HDL vont interagir avec le récepteur ABCA1 situé à la surface de nombreuses cellules périphériques, essentiellement hépatiques. Le récepteur ABCA1 est essentiel à la transformation des pré- β 1-HDL en α -HDL, comme le montrent les observations effectuées chez les sujets atteints de la maladie de Tangier de façon homozygote. Chez ces sujets, l'activité du récepteur ABCA1 est génétiquement absente et l'apo A1 n'est présente que dans des particules pré- β 1-HDL, les particules α -HDL étant absentes (). La même observation a été faite chez les souris ayant un déficit en ABCA1, souris qui présentent le même profil que les patients atteints de maladie de Tangier (), ou dans le milieu de culture de cellules sécrétant l'apo A1 et traitées par un inactivateur de ABCA1 (). Cependant, si le récepteur ABCA1 est indispensable à la transformation des pré- β 1-HDL en particules de plus grande taille, la partie C-terminale de l'apo A1 l'est également, comme le montrent des expériences dans lesquelles la partie C-terminale de l'apo A1 a été supprimée ().

Figure 3 : Modèle de pré β -HDL en 3D. 2 apoA-I tête-bêche forment une ceinture autour d'une pré- β HDL discoïdale, composée de phospholipides et de cholestérol libre.

D'après Zannis et al, 2006



4.2 Transformation des pré- β -HDL en α -HDL

Une présence basale de phospholipides au sein des particules initiales de HDL est indispensable à la captation de cholestérol cellulaire par les particules pré- β 1-HDL lors de leur interaction avec le récepteur ABCA1. Cette interaction va permettre à ces particules de capter du cholestérol libre et une quantité supplémentaire de phospholipides, ce qui entraîne une augmentation de la taille de ces particules, lesquelles se transforment en particules discoïdales appelées α 4-HDL.

Le cholestérol libre des α 4-HDL situé à la surface de ces particules est estérifié en esters de cholestérol, l'acide gras se fixant sur la molécule de cholestérol au cours de la réaction provenant des phospholipides (essentiellement de la phosphatidylcholine, qui est transformée en lysophosphatidylcholine). Cette estérification est catalysée par une enzyme plasmatique, la LCAT (lecithin cholesterol acyltransferase). Les esters de cholestérol, étant des molécules hydrophobes, vont migrer de la surface des particules vers le centre de celles-ci, ces dernières devenant sphériques. Ainsi, le gradient de concentration du cholestérol libre entre la membrane cellulaire et la surface des HDL va persister et favoriser la poursuite du processus de captation du cholestérol par les HDL. Au fur et à mesure de leur enrichissement en esters de cholestérol, ces particules deviennent sphériques et augmentent de diamètre, devenant des particules α 3-HDL, puis α 2-HDL. La poursuite de ce processus entraîne l'apparition de HDL sphériques de grande taille appelées α 1-HDL et de particules HDL de très grande taille (figure). Outre le récepteur ABCA1, d'autres récepteurs comme ABCG1 et ABCG4 permettent la captation du cholestérol membranaire des macrophages par des HDL sphériques de type α 2 ou α 1 (). ABCG1 redistribue le cholestérol cellulaire au sein de domaines qui interagissent préférentiellement avec des HDL de grande taille, et non avec des particules pauvres en lipides, comme les pré β -HDL (). L'importance relative de l'activité de ABCA1 et ABCG1 au sein des macrophages dans le processus d'efflux de l'excès de cholestérol par ces cellules n'est pas connue.

4.3 Transformation des particules α -HDL

4.3.1 Conversion des α HDL petites en α HDL larges

L'action de la LCAT sur les pré β -HDL aboutie à la formation de α HDL petites d'un diamètre d'environ 7.7 nm et ne comprenant qu'une monocouche de phospholipides de surface et 2

molécules d'apo AI. Ces lipoparticules vont être remodelées à leur tour au niveau de leur composition et leur taille. La LCAT joue là aussi un rôle essentiel et plusieurs mécanismes d'actions ont été décrits (Liang HQ. *et al.*, 1995) (Liang HQ. *et al.*, 1996) : (1) parallèlement à l'estérification du cholestérol par la LCAT, les α HDL petites acquièrent de l'apo AI via les particules pauvres en lipides et forment les α HDL larges ; (2) les α HDL larges vont être formées à la suite d'un processus de fusion des 2 particules plus petites, au cours de ce phénomène un intermédiaire instable est formé et rapidement dissocié de manière spontanée libérant au passage des particules d'apo AI pauvres en lipides ; (3) les deux processus peuvent se produire de manière concomitante.

4.3.2 Conversion des α HDL en pré β HDL

Les esters de cholestérol, générés par la LCAT et localisés au cœur des particules α HDL, vont être transférés aux lipoparticules contenant l'apo B sous l'action de la CETP. En effet, la CETP catalyse le transfert net de cholestérol estérifié des α HDL vers les lipoprotéines à apo B riches en triglycérides (essentiellement les VLDL) contre un transfert de triglycérides dans l'autre direction. Les α HDL vont alors s'appauvrir en cholestérol estérifié et s'enrichir en triglycérides, composés hydrolysables par la HL. La CETP permet donc la formation de HDL larges dont le corps lipidique est composé de plus de 30% de triglycérides et appelées HDL-TG. Ces particules représentent des substrats de choix pour la HL. Suite à cette hydrolyse de lipides (notamment les triglycérides), il apparaît une certaine instabilité des HDL-TG qui permet la formation d'une part d'une particule α HDL de petite taille et pauvre en lipides neutres appelée HDL remnant et d'autre part de pré β HDL résultant de la dissociation des composants de surface.

En effet, après incubation avec la HL, les HDL-TG (327 kDa) sont converties en pré β 1-HDL (60 kDa) et en HDL lipolysées (274 kDa) ou HDL remnants. Comparé aux HDL-TG, ces HDL remnants ont perdu une molécule d'apo AI, 60% de triglycérides et 15% de phospholipides, par contre le taux de cholestérol libre et estérifié est conservé (Barrans A. *et al.*, 1994). Ces modifications s'accompagnent d'une réduction de la taille des particules.

Les particules pré β HDL ainsi générées peuvent de nouveau accepter du cholestérol libre issu des cellules périphériques et réamorcer le transport reverse du cholestérol.

Dans le compartiment plasmatique, les HDL peuvent également connaître une étape supplémentaire de maturation sous l'influence de la PLTP (Figure 4). En effet, deux particules α HDL de taille intermédiaire peuvent fusionner, conduisant à la régénération de pré β HDL et

de particules α HDL de grandes tailles, susceptibles de ramener de grandes quantités d'esters de cholestérol au foie (Lagrost L. *et al.*, 1998).

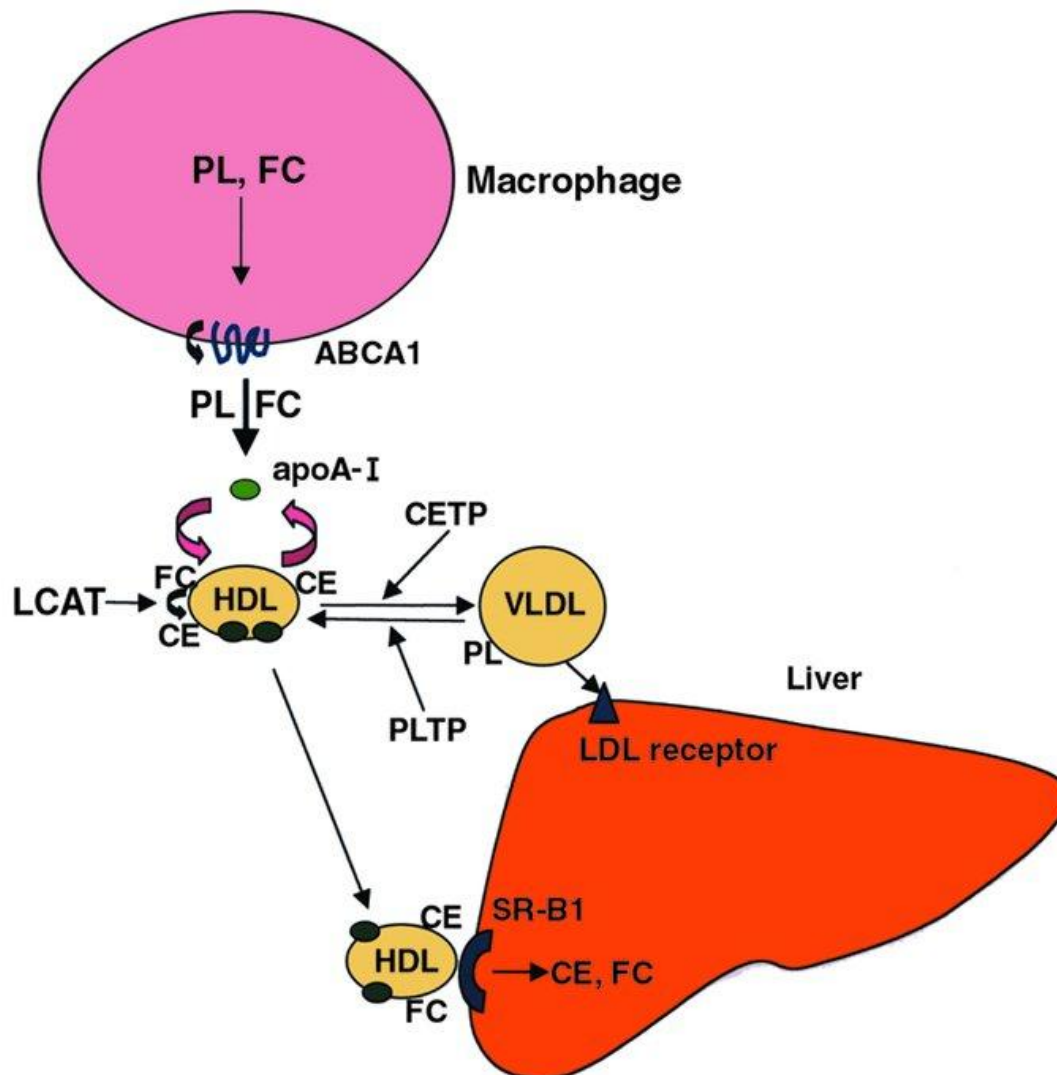
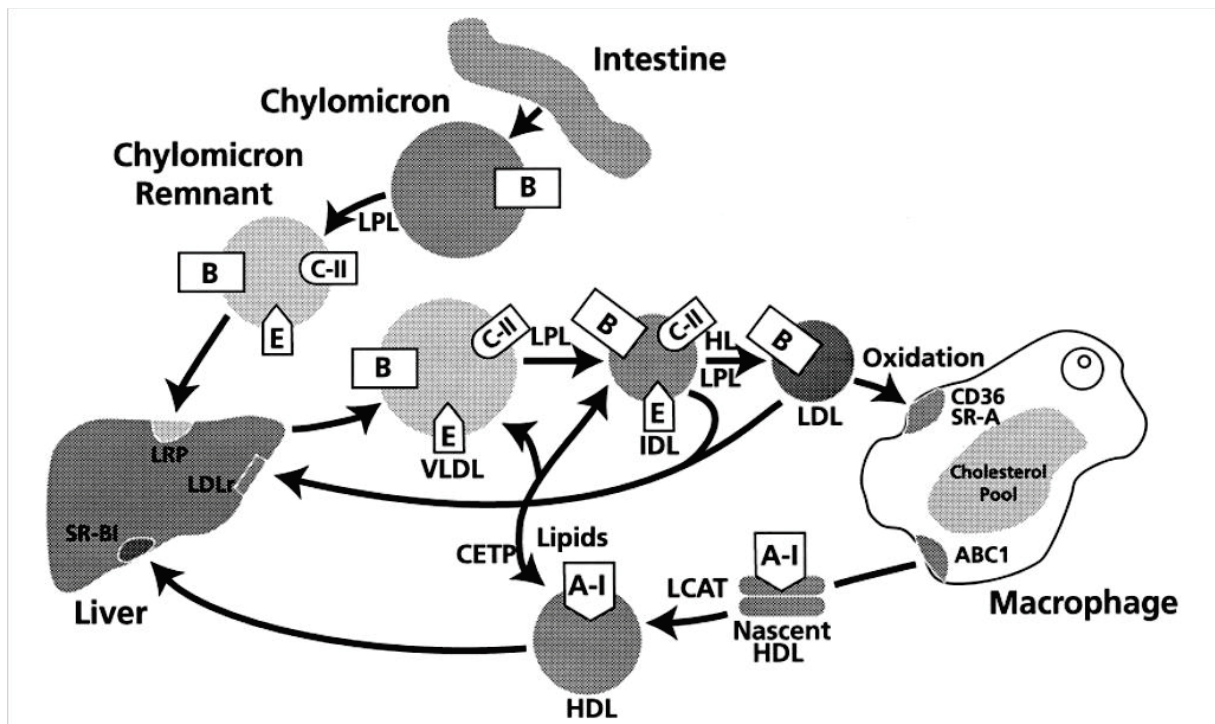


Figure 4 : Rôle de la PLTP dans le remodelage des HDL et le transport reverse du cholestérol (Alan R. Tall, Nan Wang , *J Clin Invest.* 2000)

L'importance de la PLTP au niveau du transport reverse du cholestérol a été mis en évidence grâce à l'utilisation de souris transgéniques. En effet, les souris surexprimant la PLTP humaine et les souris surexprimant à la fois la PLTP et CETP humaines génèrent trois fois plus de pré β 1 HDL que les souris témoins ou les souris surexprimant uniquement la CETP humaine (Lie J. *et al.*, 2001).

De plus on peut supposer une action synergique de la PLTP avec la CETP. En effet, l'enrichissement en triglycérides au niveau des HDL stimule le remodelage de ces particules

par la PLTP en augmentant la conversion des α HDL de taille intermédiaire en particules larges et plus petites (Rye K-A. *et al.*, 1998).



(Kwiterovich, 2000)

Figure 5 : Métabolisme des particules HDL.

Le métabolisme des HDL présente de nombreuses étapes : 1) sécrétion de l'apo A1 et association avec les phospholipides pour la synthèse des pré- β 1-HDL ; 2) addition de phospholipides et de cholestérol libre grâce à l'interaction avec des cellules par l'intermédiaire de l'activité du récepteur ABCA1 ; 3) estérification du cholestérol via l'activité LCAT et transformation des α 2-HDL en α 1-HDL et en HDL de grande taille ; 4) lipolyse des triglycérides des lipoprotéines riches en triglycérides permettant l'enrichissement des HDL en lipides ; 5) transfert des triglycérides des lipoprotéines contenant l'apo B vers les HDL, et des esters de cholestérol dans le sens inverse, cet échange étant médié par la CETP ; 6) captation sélective des esters de cholestérol par les hépatocytes grâce à l'interaction avec le récepteur SR-B1 ; 7) conversion des α 1-HDL en α 2-HDL par la lipase hépatique ; 8) fusion de particules HDL et libération de pré- α 1-HDL catabolisées par la PLTP ; 9) hydrolyse des phospholipides des α 1-HDL par la lipase endothéliale et la phospholipase permettant la synthèse des pré- β 1-HDL ; 10) catabolisme de l'apo A1 et des pré- β 1-HDL par le rein par interaction avec la cubiline. EL : lipase endothéliale ; PLTP : phospholipid transfer protein ; CETP : cholesteryl ester transfer protein ; LPL : lipase lipoprotein ; HL : lipase hépatique ; LCAT : lecithin cholesterol acyltransferase ; PL : phospholipides ; CL : cholestérol libre.

II. PATHOLOGIES ASSOCIÉES À UN DÉSÉQUILIBRE DE L'HOMÉOSTASIE DU CHOLESTÉROL

Les maladies cardiovasculaires sont essentiellement la conséquence de dépôts de cholestérol qui apparaissent et se développent au sein de la paroi des artères de calibre important. Ce phénomène est appelé athérosclérose. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique de la paroi vasculaire résultant de l'interaction entre les lipoprotéines modifiées, les monocytes, les macrophages, les lymphocytes et les cellules vasculaires.

L'athérosclérose, quand elle concerne les vaisseaux du coeur, peut provoquer une angine de poitrine ou un infarctus du myocarde. Elle peut également toucher les artères des jambes et conduire à une artérite des membres inférieurs ou encore les artères du cerveau et provoquer un accident ischémique transitoire voire un accident vasculaire cérébral. C'est cet ensemble de pathologies que l'on qualifie de maladies cardiovasculaires.

1. L'athérosclérose

L'athérosclérose, ou athérome, est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une "association de remaniements de l'intima des artères de gros et moyens calibres consistant en une accumulation focalisée de lipides, glucides complexes, de sang et de dépôts calcaires, avec remaniements de la média". L'athérosclérose est la deuxième cause de mortalité dans le monde derrière les maladies infectieuses. Il s'agit de la principale cause de mortalité dans les pays industrialisés, devant les cancers. Et elle est en forte progression dans les pays émergents.

Cette pathologie multifactorielle entraîne l'épaississement progressif de la paroi des artères et des complications à type d'obstructions aiguës ou progressives de la lumière de l'artère ou sténose, et par voie de conséquence à l'hypoxie puis à la nécrose des régions situées en aval.

1.1 Localisation de l'athérosclérose

Les plaques d'athérome se développent particulièrement au niveau des zones de contrainte mécanique, c'est à dire au niveau des branches de division, des bifurcations et des courbures artérielles. Les artères soumises à une contrainte mécanique externe sont elles aussi le siège privilégié de la formation de plaques d'athérome (comme les artères coronaires épicaudiques soumises aux mouvements de la systole ventriculaire).

L'athérome se développe le plus souvent par ordre de fréquence décroissante au niveau :

- De l'aorte abdominale,
- Des artères coronaires,
- Des artères des membres inférieurs,
- De l'aorte thoracique descendante,
- Des artères cervicales à destinée encéphalique : carotide, sous-clavière et vertébrale.

1.2 Etapes de formation de la plaque d'athérome

Cette pathologie se développe en plusieurs étapes (Figure 6) qui peuvent prendre plusieurs années.

La strie lipidique est la première étape de la formation de la plaque d'athérome. Elle est composée de cellules spumeuses qui s'accumulent dans l'intima des artères. Les cellules spumeuses sont des macrophages ou des cellules musculaires lisses gorgés de lipides, en particulier d'esters de cholestérol. Ces cellules sont formées par l'intermédiaire des LDLox (LDL oxydées) qui les "chargent" en lipides par la voie des récepteurs *scavenger* qui ne possèdent pas de rétrocontrôle. La strie lipidique se développe très tôt dans la vie (dès l'enfance), c'est une lésion réversible.

La plaque athéromateuse simple est le stade suivant. Elle est constituée de deux parties : le centre lipidique ou cœur lipidique et la chape fibreuse. Le cœur lipidique contient des lipides, des macrophages, des lymphocytes T (qui proviennent de la circulation sanguine), des cellules musculaires lisses ainsi que les cellules spumeuses. La chape fibreuse quant à elle est riche en fibres de collagène, cellules musculaires lisses et matrice extracellulaire ; elle isole le cœur lipidique de l'intima de l'artère. Pour préserver sa fonction intacte, l'artère se dilate ce qui lui permet de maintenir un diamètre interne normal. Ce phénomène s'appelle le remodelage de l'artère, il retarde la survenue des sténoses.

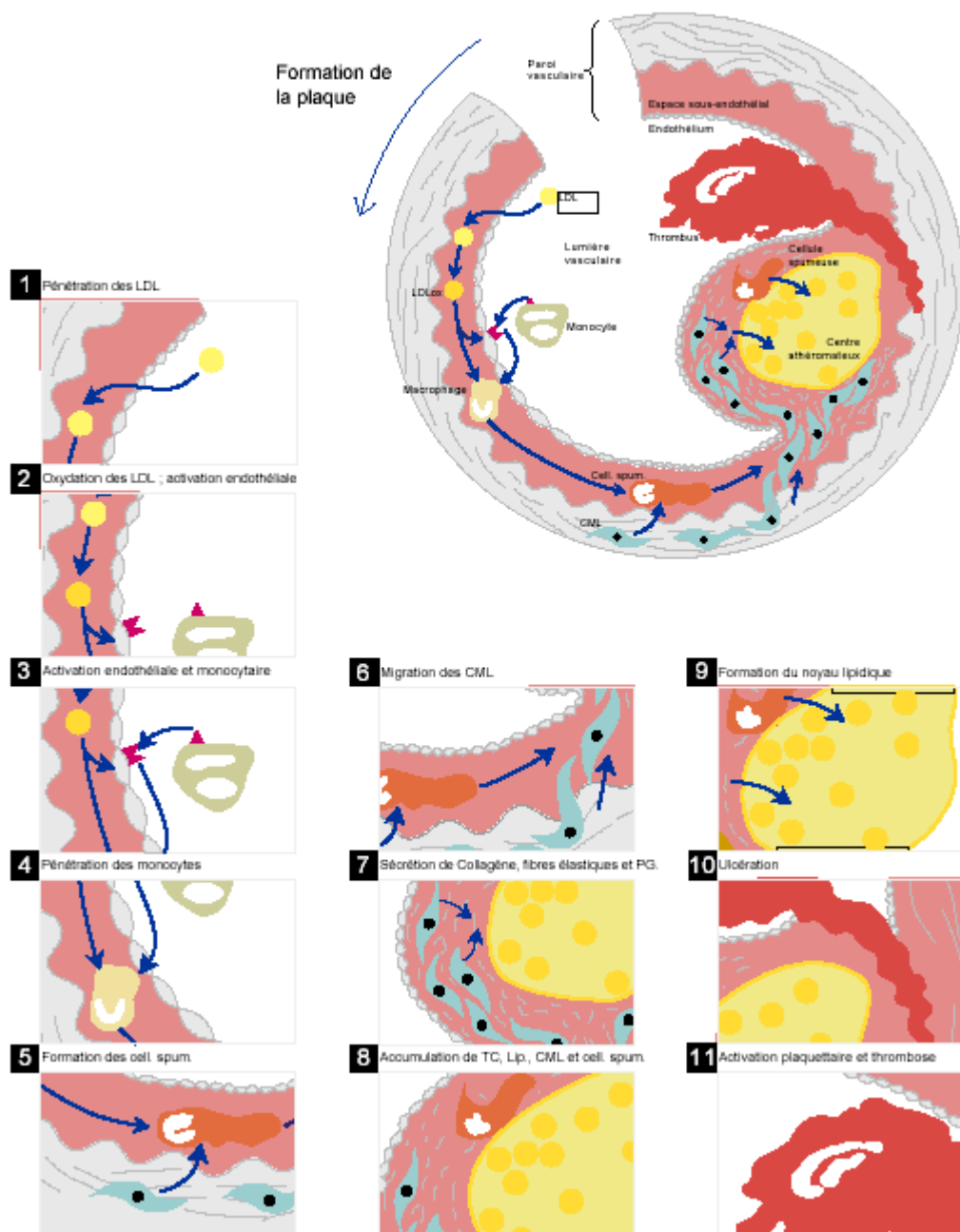


Figure 6 : Schémas des différentes étapes de formation de la plaque athéromateuse

La plaque athéromateuse simple peut évoluer en plaque athéromateuse compliquée. C'est à ce stade que surgissent les manifestations aiguës de l'athérome. Trois types de complications peuvent survenir :

- Une ulcération de la plaque correspondant à l'érosion du tissu endothélial au niveau de la plaque, ce qui entraîne la création d'un thrombus. Celui-ci est incorporé dans la plaque et participe de ce fait à son augmentation de volume,

- Une rupture ou fissure de la plaque qui résulte d'actions chimiques (action de métalloprotéases et d'enzymes protéolytiques synthétisées par les macrophages, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales) et physiques (augmentation de la tension due à l'augmentation du volume de la plaque). La rupture de plaque met des substances thrombogènes (comme des constituants de cellules nécrotiques) en contact avec le sang. La rupture peut être à l'origine de multiples sténoses en aval de la plaque par émission d'embols cruoriques qui bouchent de petites artères,

- Une hémorragie intra-plaque au niveau du cœur lipidique peut entraîner une augmentation brutale du volume de celle-ci et peut aboutir à l'occlusion complète de l'artère.

1.3 Les facteurs de risque de l'athérosclérose

Les facteurs de risque de l'athérome ont été déterminés à partir de l'observation des populations, en recherchant les éléments prédictifs de la survenue de complications liées à l'athérome.

Les maladies cardiovasculaires peuvent avoir des origines génétiques ou environnementales. Il existe de nombreuses pathologies d'origine génétique qui sont associées à des problèmes d'homéostasie du cholestérol. Il peut s'agir d'hypolipoprotéïnémie (diminution partielle ou totale d'une classe de lipoprotéines) ou hyperlipoprotéïnémie (augmentation de la concentration plasmatique d'une ou plusieurs classes de lipoprotéines).

Les principales enquêtes ayant permis de déterminer les facteurs de risque sont "l'enquête prospective parisienne", l'étude Framingham et l'étude MONICA. On oppose les facteurs de risque "modifiables" à ceux "non modifiables". L'identification de facteurs de risque modifiables permet d'initier des mesures de prévention en tentant de les supprimer ou de les atténuer.

Les principaux facteurs de risque sont le tabagisme, l'hypertension artérielle, le diabète et les dyslipidémies

1.3.1 Facteurs non modifiables

a- Antécédents familiaux

La part relative de l'hérédité et de l'environnement est difficile à chiffrer : forte incidence d'angine de poitrine dans certaines fratries, rôle indissociable des facteurs génétiques et des facteurs d'environnement. Chez des jumeaux, le caractère héréditaire de la

maladie coronarienne dépasserait 50% (Goldbourt et Neufeld, 1986). Par ailleurs des études menées dans des populations migrantes montrent que les facteurs environnementaux expliquent l'essentiel des variations de l'incidence des maladies athéromateuses entre les populations (Keys *et al.*, 1986). La majorité des cas d'athérosclérose résulte donc de l'association d'une sensibilité génétique et d'un environnement délétère (Lusis, 2003).

b- Age et sexe

L'incidence des pathologies athéromateuses augmente nettement à partir de 45 ans (maximale entre 55 et 64 ans pour les atteintes coronariennes, entre 65 et 74 ans pour les atteintes des membres inférieures). De plus l'incidence de nombreux facteurs de risque comme l'hypertension, l'hyperlipidémie et le diabète augmente avec l'âge. L'athérome coronarien survient plus tardivement chez la femme que chez l'homme, en moyenne 8 à 10ans après la ménopause. Sa fréquence est égalisée dans les deux sexes à partir de 65 ans, même en cas de traitements hormonaux substitutifs de la ménopause (Hulley *et al.*, 1998).

1.3.2 Facteurs modifiables

Ils ont l'intérêt d'être accessibles à une prévention primaire (ensemble des actes permettant de diminuer l'incidence de la maladie) ou secondaire (ensemble des actes permettant de réduire la durée de la maladie ou d'améliorer son évolution).

a- Suralimentation et obésité

Le risque de surmortalité est parallèle à l'importance de la surcharge pondérale. Elle est définie par des catégories d'indice de masse corporelle (IMC) exprimé en kg/m². Plus spécifiquement, le rôle de l'augmentation de la masse adipeuse intra-abdominale (évaluée par le tour de taille et par le rapport taille/hanche) a été souligné même en absence de surpoids. L'obésité est également associée à une augmentation d'autres facteurs de risque comme l'hypertension artérielle, le diabète ou les dyslipidémies (Emmerich et Bruneval, 2000 ; Knowler *et al.*, 2002).

b- Sédentarité et manque d'exercice physique

La sédentarité est délétère par deux aspects ; elle favorise la prise de poids et donc à terme à l'exposition à certains facteurs de risque (voir obésité) et le manque d'activité physique est corrélé de façon indépendante avec le risque coronarien : le risque d'infarctus du myocarde est 1,9 fois plus élevé chez les sédentaires. L'exercice physique doit être régulier et

modéré, un effort violent exposant au risque de thrombose (Thompson *et al.*, 2003). L'exercice physique diminue les concentrations de cholestérol total, LDL cholestérol, triglycérides et apo B, et augmente les taux de HDL cholestérol et apo AI (Leon *et al.*, 2000 ; Stefanick *et al.*, 1998). Il diminue aussi l'hypertension artérielle, la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose (Knowler *et al.*, 2002) et l'athéromatose (Thompson *et al.*, 2003). De plus, il favorise la diminution du poids et de l'adiposité abdominale et augmente l'activité anti-oxydante et la résistance des LDL à l'oxydation (Elosua *et al.*, 2003).

c- Les lipides plasmatiques

Les dyslipidémies :

Les dyslipidémies est l'une des cause principale aboutissant à l'athérosclérose.

Les dyslipidémies se définissent par des taux élevés de LDL-cholestérol (dit « mauvais cholestérol ») et/ou de triglycérides et/ou des taux bas de HDL-cholestérol (dit « bon cholestérol »).

Les dyslipidémies sont détectées grâce à l'analyse des antécédents familiaux et la réalisation d'un bilan lipidique complet.

Ainsi :

- le cholestérol total devrait être inférieur à 2g/L ,
- les Triglycérides totaux devraient être inférieurs à 1,5 g/L ,
- le LDL-cholestérol devrait être inférieur à 1,60 g/L (en l'absence d'autres facteurs de risque) ,
- le HDL-cholestérol devrait être supérieur à 0,40 g/L.

Parmi les facteurs en cause dans l'apparition des maladies cardiovasculaires, les hyperlipidémies apparaissent au premier plan. Elles ont été classifiées par Frédrickson en hyperlipoprotéïnémies familiales de type I à V.

* **L'hypercholestérolémie** est le principal facteur de risque de l'athérome. Elle est définie par un taux de cholestérol sanguin supérieur à 2,4 g/l soit 6,2 mmol/l. Il existe une relation curvilinéaire entre le taux de cholestérol plasmatique et la morbidité et la mortalité cardiovasculaires.

L'hypercholestérolémie est sous la dépendance de facteurs génétiques mais surtout sous celle du régime : il existe une relation directe entre la consommation d'acides gras saturés, l'élévation de la cholestérolémie et l'incidence des maladies coronariennes (Kimura 1970).

Un taux de cholestérol supérieur à 3 g/l multiplie par 3 le risque de maladie cardiovasculaire, à 2,40 g/l le risque est multiplié par 2. Inversement, la réduction du taux de cholestérol au sein d'une population s'accompagne d'une diminution du risque cardiovasculaire. Toutefois la moitié des patients atteints de pathologies cardiovasculaires n'a pas d'hypercholestérolémie, il existe donc d'autres facteurs métaboliques à prendre en compte.

Le risque d'athérome est principalement lié aux types de lipoprotéines qui transportent le cholestérol. On considère que seules les lipoprotéines de basse densité LDL et VLDL ont un pouvoir athérogène (Cullen et al., 1998) lorsqu'elles sont présentes en excès. De plus, des études ont montré qu'une réduction de 30% du LDL cholestérol diminuait significativement le risque coronarien en prévention primaire comme en prévention secondaire (Bucher et al., 1999). Par contre, les HDL ont un pouvoir protecteur vasculaire car elles assurent l'excrétion des autres types de lipoprotéines par la paroi artérielle. C'est donc plus le rapport cholestérol total/HDL cholestérol que le chiffre absolu de cholestérol total sérique qui devrait être pris en compte pour l'estimation du risque athérogène. Cette notion pourrait expliquer certaines constatations épidémiologiques : la consommation d'alcool stimule la synthèse des HDL, par contre celle d'oestrogénostatifs (pilule contraceptive) la diminue, le HDL cholestérol est plus élevé chez la femme non ménopausée que chez l'homme du même âge.

* **L'hypertriglycéridémie** est une autre dyslipidémie dont le rôle demeure controversé dans la littérature. De nombreuses études montrent qu'il ne s'agit pas d'un facteur de risque indépendant alors que d'autres montrent au contraire qu'elle est associée de manière indépendante à un risque accru de maladies cardiovasculaires (Cullen et al., 1998).

* **Les hypolipoprotéinémies**

L'abêtalipoprotéinémie est caractérisée par une absence totale de chylomicrons résultant d'un manque de MTP (*Microsomal Triglycerid Transfert Protein*).

Les hypolipoprotéinémies familiales sont caractérisées par une diminution de 40 à 90% du taux de VLDL.

D'autres affections se caractérisent par un déficit voire une absence d'apo AI : maladie de Tangier, "*fish-eye disease*" ou maladie de l'oeil de poisson, ...

* Enfin, **le rôle réel de la Lp(a)** demeure très discuté ; un taux élevé étant associé à une fréquence accrue d'événements coronariens.

d- Le tabagisme

La consommation de tabac est prothrombogène (Law *et al.*, 1997).

C'est un facteur de risque bien établi, dès quatre cigarettes par jour. Le seul tabagisme multiplie le risque relatif de maladie coronaire par 3,6 et 4,7 respectivement, chez l'homme et la femme. Le mode d'intoxication ne modifie pas le risque. L'arrêt de l'intoxication permet de retrouver un niveau de risque de "non fumeur" au bout de 2 ans. Le mécanisme d'action du tabac dans le déterminisme de l'athérome artériel est complexe, il agit sur de nombreux paramètres. Les différents composés de la fumée de cigarette (monoxyde de carbone, nicotine, semi-quinones des goudrons) induisent un stress oxydatif important qui entraîne une peroxydation lipidique (Mezzetti *et al.*, 1995), une altération mitochondriale des cellules vasculaires (Knight-Lozano *et al.*, 2002) et des dysfonctionnements de l'endothélium (Pitillo, 2000). Il en résulte une augmentation de la perméabilité capillaire qui facilite le passage des lipoprotéines, leur accumulation et leur modification oxydative.

e- L'hypertension artérielle

C'est un facteur de risque majeur. Des chiffres supérieurs à 140 mm Hg de systolique ou 90mm Hg de diastolique définissent l'hypertension artérielle. L'hypertension agit en augmentant les forces de cisaillement au niveau des vaisseaux qui favorisent l'adhésion des monocytes à l'endothélium, ce qui entraîne un état inflammatoire vasculaire (Libby *et al.*, 2002 ; Ross, 1999).

f- Le diabète

Un diabète avéré ou une anomalie du métabolisme glucidique sont observés dans 30% des angines de poitrine. On admet classiquement que le diabète multiplie le risque coronarien par 3. Outre ses effets sur le profil lipidique (Emmerich et Bruneval, 2000 ; Peppia *et al.*, 2002) le diabète, et en particulier l'hyperglycémie, induit un stress oxydatif qui oxyde les LDL et augmente la production de cytokines pro-inflammatoires (Libby *et al.*, 2002).

Le diabète peut-être un facteur de risque héréditaire et non modifiable.

g- Autres facteurs de risque

○ Homocystéinémie : il s'agit d'un marqueur de risque déjà très anciennement connu mais débattu, son rôle n'a été formellement identifié que relativement récemment. Le taux d'homocystéine sérique est plus élevé chez les sujets porteurs d'artériopathie ou de

coronaropathie que chez les sujets sains. Il est plus élevé chez les hommes que chez les femmes ().

- Molécules de la coagulation : des concentrations sanguines élevées en fibrinogène, PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor 1*), facteur VII de la coagulation ainsi que l'augmentation de la réactivité plaquettaire sont fréquemment associés à un risque coronarien augmenté (Assmann *et al.*, 1999).

- Molécules de l'inflammation : l'athérosclérose est une pathologie ayant une composante inflammatoire importante qui est impliquée dès l'initiation du développement de la plaque. Elle contribue à sa progression et à son instabilité (Ross, 1999). Des concentrations plasmiques modérément élevées de marqueurs de syndromes inflammatoires comme la CRP (protéine C réactive), l'IL-6 (interleukine 6), le TNF-a (*Tumor Necrosis Factor a*), le fibrinogène, et de molécules d'adhérence comme ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*), sont associées à un risque coronaire élevé (Libby *et al.*, 2002). La CRP est un marqueur inflammatoire indépendant du risque cardiovasculaire, une concentration élevée > 3mg/ml est corrélée à la survenue primaire d'événements coronariens (Danesh *et al.*, 2000). Néanmoins elle reste aspécifique puisqu'elle aussi présente dans d'autres pathologies inflammatoires.

Nous avons vu que l'athérosclérose est une pathologie avec une composante oxydative importante. Les LDLox ont un pouvoir athérogène très important. Les dérivés oxydés du cholestérol, appelés aussi oxystérols ou oxycholestérols, composent une partie des LDLox.

2. L'hypercholestérolémie familiale

L'hypercholestérolémie familiale représente un modèle judicieux de risque cardiovasculaire élevé, ce qui offre l'opportunité d'étudier les causes et les effets du développement précoce de l'athérosclérose.

L'hypercholestérolémie familiale est une maladie en apparence bien connue des médecins, mais en réalité le dépistage familial et le diagnostic clinique ou génétique sont rarement faits de façon adéquate. De plus, ces patients restent largement sous-traités. Les progrès de la génétique ont été importants avec la découverte d'une nouvelle forme d'hypercholestérolémie familiale autosomique dominante. Il s'agit d'une découverte française importante dans l'histoire de la compréhension de l'hypercholestérolémie familiale dont les conséquences ont toutes les chances d'avoir des répercussions thérapeutiques à moyen et long terme ().

Le terme d'hypercholestérolémie familiale est, en fait, trompeur dans la mesure où il sous-entend qu'il s'agit de la forme autosomique dominante. Beaucoup parlent de forme familiale quand il y a des antécédents familiaux, mais ce critère n'est pas suffisant, loin s'en faut. Dans la forme autosomique dominante, il existe l'hypercholestérolémie hétérozygote classique et fréquente (1 naissance sur 500) qui sera traitée dans cet article. La forme homozygote est très différente et responsable d'accidents cardiovasculaires mortels, souvent dans l'adolescence. Elle est très exceptionnelle (1 naissance sur 1 million) et son traitement ne se conçoit que dans des milieux très spécialisés ().

2.1 Clinique

Contrairement aux formes polygéniques, les formes familiales entraînent une élévation du cholestérol dès la naissance, si bien que les sujets ont un temps d'exposition à la maladie plus long et, à niveau de cholestérol identique à l'âge adulte, un risque cardiovasculaire plus élevé. Il existe d'ailleurs une altération précoce de la fonction artérielle chez ces sujets (). L'élévation du cholestérol est évidente par rapport aux données obtenues dans la population des enfants ou adultes français (). Le diagnostic repose sur une combinaison de critères. Il faut un score de 8 points pour l'affirmer (Tableau__). Dans les cas difficiles et même actuellement de façon de plus en plus systématique, le diagnostic génétique peut être fait dans un centre spécialisé. Sur un plan clinique, la présence de xanthomes est très rarement recherchée. Pourtant ils sont le plus souvent simples à mettre en évidence sur les tendons d'Achille ou sur les extenseurs de la main. Leur présence permet d'affirmer le diagnostic. A l'inverse, ils sont absents chez certains patients, en particulier quand le traitement a été mis en route à un âge jeune.

Une étude récente a montré que les xanthomes étaient un puissant facteur prédictif du risque cardiovasculaire ().

L'anomalie a donc, comme suggéré par le Tableau 1, un caractère autosomique dominant, avec une élévation marquée du LDL-cholestérol, des xanthomes tendineux et un risque cardiovasculaire élevé. Les accidents les plus précoces dans la forme hétérozygote surviennent à partir de l'âge de 20 ans, mais sont classiquement et en l'absence de traitement observés chez l'homme vers l'âge de 50 ans.

2.2 Génétique et physiopathologie

C'est dans les années 70 que Brown et Goldstein, prix Nobel de médecine, ont identifié le premier mécanisme responsable d'hypercholestérolémie familiale autosomique dominante.

C'est la mutation du récepteur cellulaire des particules LDL qui est directement responsable de l'augmentation du LDL-c dans la circulation sanguine. Ce récepteur est présent sur l'ensemble des cellules de l'organisme, mais sur un plan quantitatif est dominant au niveau du foie. Cela explique que deux tiers des LDL soient catabolisées au niveau hépatique. Sa mutation est responsable de la classique xanthomatose familiale tendineuse, qui touche 1 Français sur 500. Récemment il a été montré que le type de mutation du récepteur avait une valeur pronostique ().

Environ 10 ans plus tard, la deuxième cause d'hypercholestérolémie familiale autosomique dominante était identifiée.

Il s'agit de la mutation portant sur un des ligands du récepteur des LDL, l'apoprotéine B 100. Une mutation sur l'acide aminé 3 500 est responsable d'une altération de la liaison de l'apoprotéine B au récepteur des LDL et d'une hypercholestérolémie familiale, très proche de la précédente. Ces deux maladies diffèrent par le fait que les mutations sur le récepteur LDL sont extrêmement nombreuses : près de 1 000 ont été décrites.

A l'inverse, les mutations responsables d'hypercholestérolémie et touchant l'apoprotéine B 100 sont très peu nombreuses. C'est en grande partie grâce à une équipe française que la troisième grande cause d'hypercholestérolémie familiale a pu être identifiée comme étant liée à des mutations d'un gène appelé Proprotein Convertase Subtilising Kaixing 9 (PCSK9) (5). Le rôle exact de PCSK9 dans le métabolisme du cholestérol reste inconnu. Il subit une régulation similaire à celle du récepteur LDL. La surexpression de PCSK9 entraîne une diminution majeure de l'expression du récepteur LDL au niveau du foie. A l'inverse, les animaux KO pour PCSK9 ont une surexpression du récepteur LDL. Globalement, il s'agit donc d'un régulateur de l'expression de ce récepteur. La dégradation du récepteur LDL semble se faire au niveau de l'appareil de Golgi, et surtout semble être spécifique du foie. Cela explique que les études initiales sur ce type d'hypercholestérolémie n'aient pas mis en évidence sur des biopsies de peau d'anomalie de l'activité LDL-récepteur sur les fibroblastes ou sur d'autres cellules.

La spécificité de l'anomalie au niveau hépatique est d'ailleurs une belle illustration du rôle central du foie dans le métabolisme du LDL-c. De façon plus inattendue, une équipe américaine a identifié d'autres mutations de PCSK9 qui entraînent une hypocholestérolémie. Les patients présentant cette hypocholestérolémie génétique ont un effondrement de leurs risques cardiovasculaires.

2.3 Traitement de l'hypercholestérolémie familiale

En mars 2005, l'Afssaps a publié les recommandations pour la prise en charge thérapeutique des patients en prévention primaire et secondaire (Tableau __) (). Elle a établi les cinq seuils d'intervention pour les patients à faible, moyen et haut risque.

Ces seuils d'intervention portent sur le LDL-c et tiennent compte essentiellement du nombre de facteurs de risque ou de la situation cardiovasculaire des patients.

Ces recommandations excluent de son champ l'hypercholestérolémie familiale car son pronostic est péjoratif et le traitement doit mis en route plus tôt ().

Des recommandations récentes sont disponibles (NICE) (), et des recommandations françaises spécifiques sont en cours de préparation.

La prise en charge thérapeutique par le régime ne sera pas détaillée ici. Elle est un préalable indispensable au traitement quel que soit le contexte. L'idée que le régime est peu utile du fait de la puissance des statines est non seulement fausse, mais, de plus, est une incohérence en termes de santé publique. En fait, les bases de la diététique hypocholestérolémiante chez les sujets avec hypercholestérolémie familiale sont proches des grandes recommandations nutritionnelles pour la population (Politique nutritionnelle, rapport du Haut Comité de santé publique)

2.3.1 La prise en charge médicamenteuse : les moyens

a- Statines

Les statines sont clairement le traitement de base des formes familiales. Toutes les statines peuvent être utilisées, mais les niveaux élevés de LDL-c font que les deux statines les plus puissantes sont plus souvent privilégiées (atorvastatine et rosuvastatine). La lovastatine a été la première statine à être testée chez l'enfant (). La pravastatine (dose de 20-40 mg) a été étudiée dans une large étude comprenant 214 enfants (8-18 ans) suivis pendant 2 ans avec hypercholestérolémie familiale.

La baisse du LDL-c a été celle attendue, compte tenu des résultats chez l'adulte. Une mesure de l'épaisseur intima-média a été réalisée au début et à la fin de l'étude : dans le groupe traité, une diminution de 0,010 mm a été observée, alors que dans le groupe placebo une augmentation de 0,014 mm est survenue (). Aucun effet secondaire (hormonal, musculaire, stade de puberté) n'a été rapporté comme étant significativement plus fréquent chez les enfants traités.

b- Résines séquestrantes de cholestérol

La colestyramine (Questran) est une résine chélatrice des sels biliaires. Il existe assez peu d'études récentes avec cette molécule. Elle entraîne une baisse du LDL-c de l'ordre de 20% avec 2 ou 3 sachets. La colestyramine a longtemps été le traitement de base des sujets atteints de forme familiale. Elle est actuellement moins utilisée, du fait des résultats thérapeutiques obtenus avec les statines chez les adultes et chez les enfants. Elle peut être utilisée en monothérapie en seconde intention quand il y a une intolérance aux statines ou en association avec les autres hypolipémiants. Une règle essentielle est de donner ce traitement à distance des autres en raison des interférences possibles d'absorption des médicaments. Les inconvénients majeurs sont les effets secondaires notables, mais non dangereux (constipation). Il a été décrit un risque de diminution de l'absorption des vitamines liposolubles, notamment de la vitamine D. Les patients se plaignent parfois de changement du goût, de sensation de nausée et de ballonnement. Mais, avec le temps, les effets secondaires tendent à s'estomper.

Le colesevelam (non encore disponible en France) est une nouvelle résine dont l'efficacité est voisine de celle de la colestyramine, mais dont la tolérance est nettement meilleure. En particulier du fait de sa présentation en comprimés, les problèmes d'observance liés au mauvais goût de la colestyramine sont nettement atténués. De même, la tolérance digestive, en dehors de quelques cas de constipation, est habituellement proche de celle du placebo. Les effets sont additifs à ceux des statines et de l'ézétimibe, si bien que cette résine peut être utilisée en trithérapie chez les sujets ayant une hypercholestérolémie familiale non corrigée. Le colesevelam diminue l'hémoglobine glyquée sans que le mécanisme soit bien clair.

c- Dérivés des fibrates et l'acide nicotinique.

Les dérivés des fibrates sont à exclure dans l'hypercholestérolémie pure. En effet, l'efficacité est réduite en termes de baisse de LDL-c et de baisse des événements cardiovasculaires dans les sousgroupes hypercholestérolémie pure des grands essais d'intervention (le bénéfice étant constamment observé dans les sous-groupes hypertriglycéridémiques et hypo- HDLémiques).

L'acide nicotinique (Niaspan) entraîne une diminution additive de 20% du LDL-c et en parallèle une augmentation de 20% du HDL-c. L'utilisation du produit est actuellement limitée par la tolérance médiocre (fréquents flushs). La place des fibrates et de l'acide nicotinique se situe donc plutôt dans les formes associant hypertriglycéridémie et hyperlipidémie familiale et est à discuter en milieu spécialisé.

d- Ezétimibe

L'ézétimibe (Ezétrol) est un inhibiteur de l'absorption du cholestérol au niveau digestif. Le produit est en moyenne très bien toléré et entraîne en association avec les statines une diminution de l'ordre de 20% du LDL-c. Le produit a été testé dans une étude dont le critère de jugement était l'épaisseur intima-média. Les résultats de cette étude n'ont pas montré d'amélioration de l'épaisseur intima artérielle ().

Toutefois, ces résultats négatifs s'expliquent très probablement par le dessin de l'étude et la population testée. Ce traitement est donc celui qui est habituellement associé aux statines.

e- Autres molécules

D'autres molécules sont en développement et offrent des perspectives intéressantes si leur tolérance se confirme comme étant bonne. Le mipomersen est un oligonucléotide antisens dirigé contre le RNA de l'apo B, ce produit inhibe la synthèse de l'apo B, et une baisse du LDL-c de plus de 20% additive aux autres traitements a été retrouvée (). Surtout pour le traitement des formes sévères (homozygote notamment) où les statines n'ont pas d'effet, car c'est un traitement lourd a réalisé.

2.3.2 Conduite du traitement

Il existe schématiquement deux tendances : une normalisation parfaite du LDL-c à partir de l'âge de 8 ans (recommandations américaines) et un traitement plus nuancé qui consiste à considérer que l'hyperlipidémie familiale est un facteur de risque supplémentaire. On peut donc se caler sur les recommandations en diminuant d'un seuil de LDL-c le niveau de décision. Ainsi tous les enfants qui ont plus de 1,90 g/l sont traités au moins par une dose faible de statine (par exemple 20 mg de pravastatine). Ce seuil peut être nuancé en fonction essentiellement des antécédents familiaux et du HDL-c puisque les autres facteurs de risque sont habituellement absents. Chez l'adulte, il est difficile de donner un objectif thérapeutique précis car celui-ci dépend aussi de la lourdeur du traitement parfois nécessaire pour obtenir un LDL-c bas et des autres facteurs de risque. En pratique chez un adulte jeune, le LDL-c doit être au minimum inférieur à 1,60 g/l. La surveillance du traitement par statine comprend un dosage des transaminases et des CPK chez les sujets ayant des symptômes musculaires. En pratique, on donne une statine à la dose tolérée, et en cas de non-atteinte des objectifs l'ézétimibe est associé. En cas d'insuffisance de l'effet, une trithérapie avec une résine peut se discuter.

2.3.3 L'aphérèse des LDL

L'aphérèse des LDL est une technique qui constitue un traitement de choix pour les patients atteints d'HF HMZ, chez qui les traitements pharmacologiques n'ont que peu d'effets. Ce traitement consiste en une précipitation extracorporelle des particules LDL à l'aide d'héparine et en une filtration du précipitat obtenu. Cette technique permet une réduction du cholestérol-LDL de l'ordre 60%.

Les LDL-aphérèses étaient réalisées toutes les 2 semaines avec le **système d'aphérèse COBE® Spectra** sur sang total avec les **colonnes de fractionnement du plasma Evaflux 5A** (). Ces colonnes sont composées de copolymères d'alcool vinyl d'éthylène (EVAL).

L'appareil d'aphérèse COBE Spectra est la plate-forme technique d'aphérèse thérapeutique la plus largement utilisée dans le monde avec la plus grande variété de protocoles d'aphérèse thérapeutique.

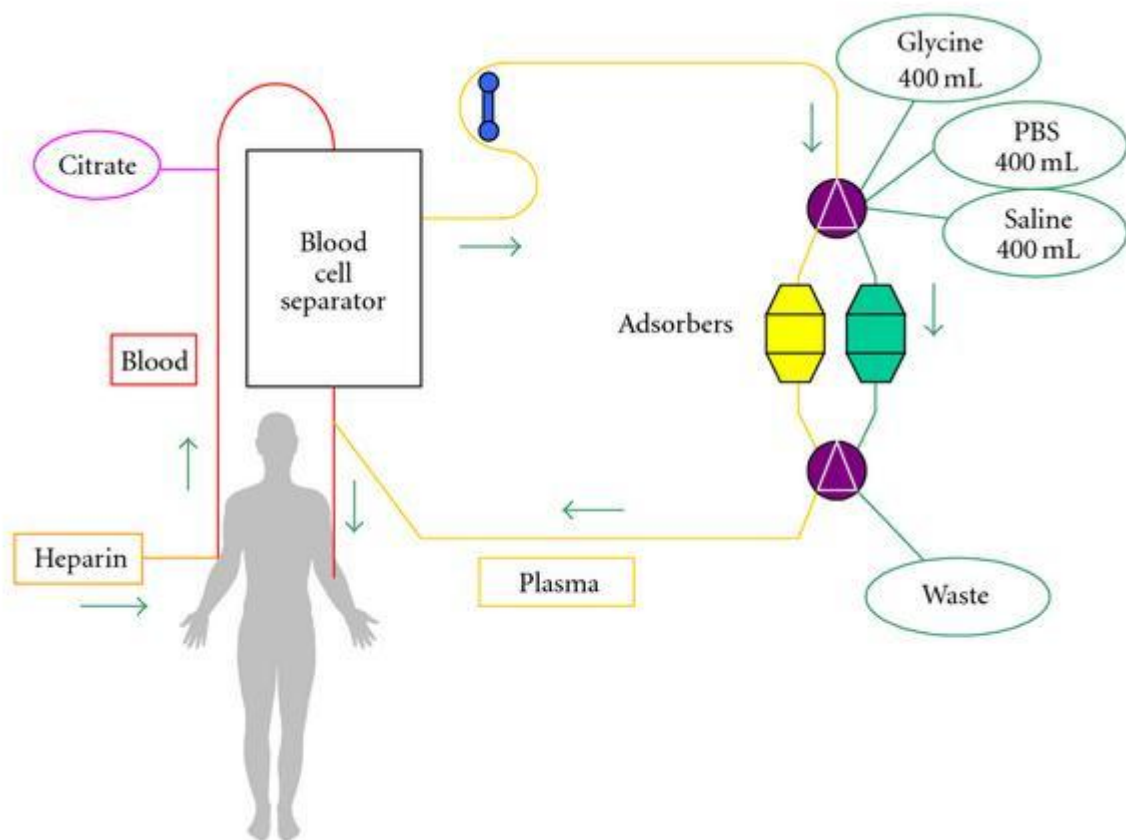


Figure 7: Principe de l'absorption des lipoprotéines (modifiée by Borberg et al., 2009).

Ce procédé permet une adsorption des lipoprotéines athérogènes à partir du sang total par interaction électrochimique, dans une colonne contenant des billes de polyacrylamide, entre la charge positive de l'apoB100 du LDL-C et la charge négative de l'acide polyacrylique. (Figure 7)

Pour le projet sur les microparticules circulantes, les séances d'aphérèse ont été réalisées dans l'unité de LDL-aphérèse du Royal Perth Hospital en présence d'un(e) infirmière/infirmier, avec surveillance continue de la fréquence cardiaque et de la saturation en oxygène. La durée d'une séance était de 2h. Deux voies veineuses périphériques (cathéter 18G) étaient posées en position antécubitale à chaque. Le sang était anticoagulé par 1 bolus d'héparine non fractionnée et par une perfusion continue d'anticoagulant citrate dextrose solution A (ACD-A).

Le traitement est accompagné d'un bilan lipidique, une numération et un bilan d'hémostase avant et après chaque séance. Cette procédure ne présente habituellement pas d'effet secondaire. Une légère hypotension peut parfois se faire sentir après le traitement.

Les techniques d'*aphérèse* ont énormément progressé. Elles permettent l'extraction sélective des LDL sériques. Mais elles ne sont que partiellement efficaces et doivent être associées à un traitement (généralement une statine et/ou de la cholestyramine) afin de limiter la vitesse de remontée du cholestérol. Elles doivent être renouvelées toutes les deux semaines (chez les homozygotes) ou toutes les quatre semaines (chez les hétérozygotes), la vie durant. Ceci pose bien sûr des problèmes pratiques chez des sujets souvent jeunes, dont le rythme de vie est de ce fait modifié.

III- La protéine C-réactive ou *C-reactive protein* (CRP)

Plusieurs marqueurs sont utilisés en pratique clinique, d'autres dans les études cliniques mais très peu de biomarqueurs de l'inflammation répondent à tous ces critères. Parmi eux, la protéine C-réactive (CRP) semble être le plus puissant biomarqueur de l'inflammation indépendant prédictif du risque cardiovasculaire mais ses effets moléculaires et cellulaires ne sont pas encore clairement définis.

1. Caractéristiques générales, origine et utilisation de la CRP

1.1 Historique

Découverte en 1930 par Tillett et Francis, la protéine C-réactive (CRP) a été isolée à partir de sérums de patients atteints d'une infection par *Streptococcus pneumoniae*. Elle tient son nom de la réactivité qu'elle exerce vis-à-vis du polysaccharide C contenu dans la paroi cellulaire des pneumocoques. Elle a été purifiée par *MacLeod et Avery* en 1941 et cristallisée en 1947 par *McCarty*.

1.2 Structure

La CRP est une protéine pentamérique non glycosylée, cyclique, dont chaque unité comprend 207 acides aminés. Elle est en effet constituée de cinq chaînes polypeptidiques identiques formant un anneau de cinq éléments (Figure 8). (Pepys M.B., et al., 1985 ; Black S. et al., 2004)

- Son poids moléculaire est de 115 KDa. Elle appartient à la famille des pentraxines.
- Son gène est situé sur le chromosome 1 en q2.1.
- Il n'y a pas de polymorphisme connu de ce gène. Aucune déficience en CRP n'est connue. L'absence de transcription du gène de la CRP est peut-être non viable.

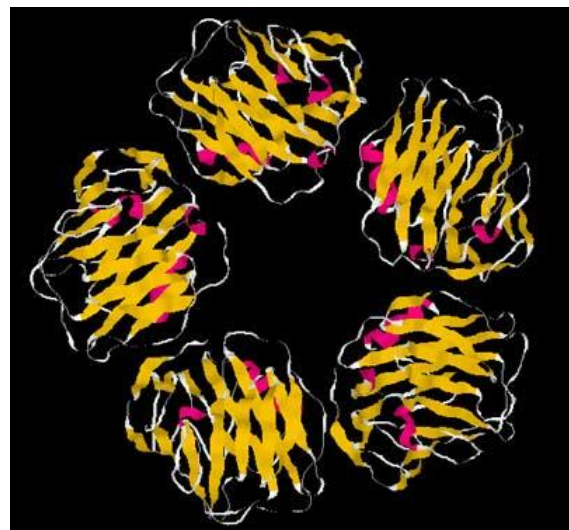


Figure 8 : Structure en trois dimensions du pentamère de la CRP (Image adaptée de Paul Ridker, 2002).

La protéine est constituée de cinq chaînes polypeptidiques identiques formant un anneau de cinq éléments.

1.3 Synthèse

La CRP est synthétisée par les hépatocytes dès le début du processus inflammatoire sous l'action des cytokines, principalement IL6. Cette dernière est produite par de nombreuses cellules: fibroblastes, monocytes, macrophages, lymphocytes, ostéoblastes, cellules épithéliales et endothéliales.

Le taux de CRP s'élève dans les trois heures qui suivent la sécrétion de l'IL6 et diminue très rapidement en 24 heures, dès l'arrêt de sécrétion.

1.4 Cinétique

Elle fait partie des protéines de la réaction inflammatoire (PRI) positives à cinétique rapide, comme le Serum Amyloïde A et l'alfa1 antitrypsine. Elle migre en électrophorèse dans la fraction des gammaglobulines. Sa concentration plasmatique peut être multipliée par plus de 100 en six à dix heures. Elle s'élève dès la sixième heure de l'inflammation (cinétique rapide).

Sa demi-vie est courte, de huit à douze heures. Sa concentration retourne à la normale en trois à quatre heures dès que le processus inflammatoire est contrôlé

• Valeur normale de la CRP

Chez le sujet sain, la concentration sanguine de la CRP est inférieure ou égale à 6 milligrammes par litre (mg/l). La limite de dosage de la CRP par microméthode est de 8 mg/l (soit considérée comme normale quand elle est inférieure à 8 mg/l). Sa valeur n'est ni modifiée par l'âge ni par la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou d'immunosuppresseurs. Sa concentration augmente lors de situations non pathogènes : la prise d'oestrogènes et durant toute la grossesse et l'inhalation de fumée de cigarettes.

1.5 Méthodes de dosage

Ils existent trois méthodes de dosage de la CRP :

- radio-immunologique ;
- électro-immuno-diffusion ou immuno-turbidimétrique : test d'immunoagglutination au latex, ce dernier fixant les anticorps anti-CRP et l'agglutination étant visible sur une lame, une dilution permet ensuite de quantifier la CRP ;
- immuno-néphélométrique, essentiellement utilisée pour doser la CRP ultrasensible comme marqueur cardiaque.

Les deux dernières méthodes sont les plus couramment utilisées.

Pour doser la CRP, il faut effectuer un prélèvement de sang veineux sur anticoagulant EDTA, de sérum ou de sang capillaire. Il est préférable d'être à jeun mais, en urgence, ce critère est rarement respecté. L'unité de mesure est le mg/l.

Le test rapide est un dosage semi-quantitatif sur sang total utilisant le principe d'immunochromatographie. Il a une excellente répétabilité, une quasi absence d'effet crochet pour des valeurs très élevées et une robustesse par rapport aux interférences classiquement testées : hémolyse, turbidité, bilirubine (). L'effet crochet est l'inconvénient majeur de la méthode « sandwich ». En effet, l'excès d'antigènes (ici, la CRP) sature la majorité des sites de liaison des anticorps, ce qui entraîne la sous-estimation des résultats par saturation des anticorps de dosage. La courbe d'étalonnage présente dans ce cas un aspect parabolique. Cet effet est circonvenu en utilisant des techniques en deux étapes avec lavages et en pratiquant des dilutions sériées de l'échantillon.

Il existe une excellente corrélation avec le dosage par macrométhode de la CRP ().

Le test par microméthode nécessite des étalonnages réguliers et il existe une traçabilité pour chaque test.

Le coût du dosage au laboratoire est B35 soit 9,45 euros. Le coût en microméthode est de 2,94 euros par acte.

1.6 Variations cliniques

La CRP est augmentée au cours :

- de maladies infectieuses : infection bactérienne, infection virale (mais élévation modérée), infection parasitaire ;
- des hépatopathies (mais reste normale dans les hépatites cytolitiques) ;
- des affections rhumatismales : la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, les vascularites, la maladie de Horton, la pseudopolyarthrite rhizomélique ;
- des nécroses tissulaires ;
- des phases postopératoires ;
- des affections néoplasiques ;
- des maladies thromboemboliques.

Elle reste basse dans le lupus érythémateux disséminé y compris en poussée, le syndrome de Gougerot-Sjögren (est augmentée en cas d'infection intercurrente), la rectocolite hémorragique, la leucémie et la réaction du greffon contre l'hôte.

Le dosage de la CRP sert aussi dans le dépistage d'une infection néonatale (elle ne passe pas la barrière placentaire).

Depuis quelques années, des études ont montré que la CRP peut être un facteur prédictif d'une future maladie cardio-vasculaire chez les patients ayant de l'athérosclérose (Bayes-Genis A., et al., 2001).

La concentration plasmatique diminue dans une seule situation clinique : en cas d'insuffisance hépatocellulaire très sévère.

La CRP est un marqueur fiable du suivi évolutif du phénomène inflammatoire. Elle est pour le clinicien un examen biologique :

- fiable : peu de faux positifs ;
- pratique : résultat en 15 à 30 minutes ;
- fidèle : marqueur non spécifique mais le plus fidèle de la phase aiguë de l'inflammation ;
- rapide : l'augmentation des concentrations commence six heures après le début de l'inflammation ou de l'acte opératoire et le retour à la normale se fait en quatre jours ;
- quantitatif : plus le syndrome inflammatoire ou l'acte chirurgical est important, plus les taux de CRP vont augmenter ;
- économique : accélère les prises de décisions et raccourcit la durée d'hospitalisation, comme le montrent certaines études menées en chirurgie orthopédique ().

Plusieurs études ont montré la supériorité de la CRP par rapport aux autres prélèvements biologiques comme la numération-formule sanguine, le nombre absolu de polynucléaires neutrophiles, les hémocultures, pour détecter la présence d'une infection bactérienne (Kaftan A.H. et al., 2000).

1.7 Rôle de la CRP

La CRP joue un rôle dans l'immunité innée non spécifique en participant à l'opsonisation des bactéries et à l'activation du complément par la voie classique. D'autre part, elle joue un rôle d'éboueur en transportant des substances biologiques comme de l'acide désoxyribonucléique (ADN), des nucléotiques, des lipides et des polysaccharides (Volanakis J.E. *et al.*, 2001).

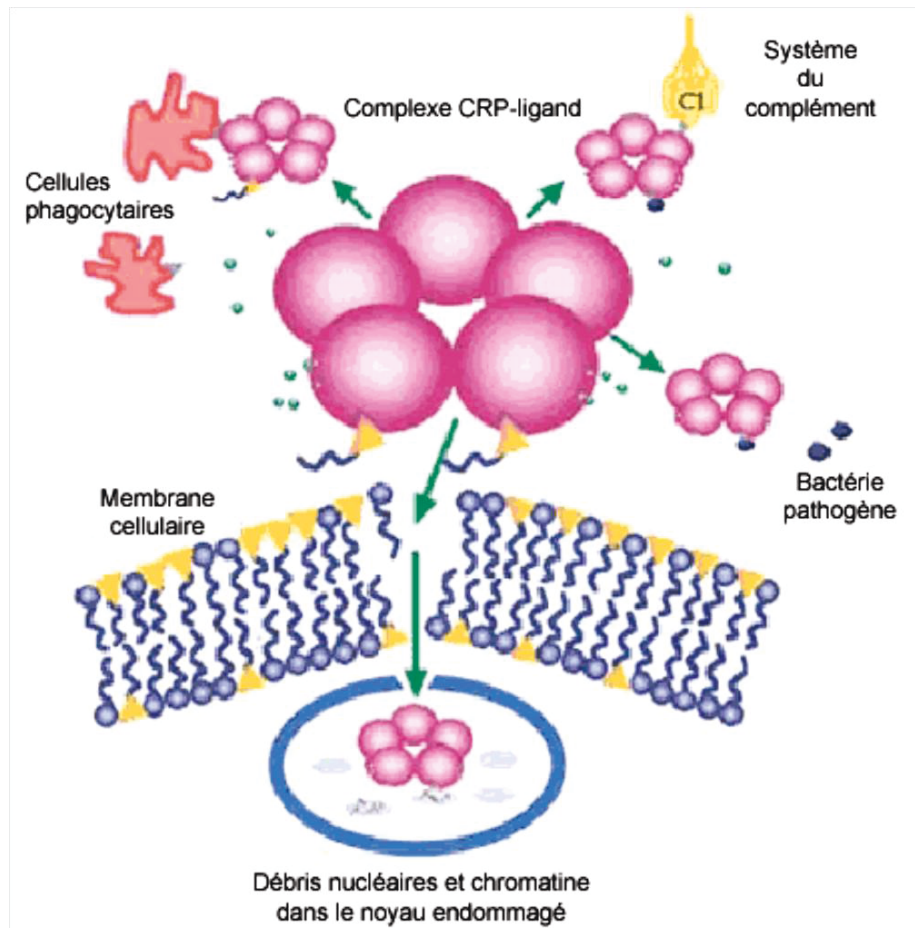


Figure 9 : Les différentes fonctions associées à la CRP. Modifié d'après DuClos, 2003.

Les différentes fonctions de la CRP (Figure 9) sont :

- de favoriser l'opsonisation indépendamment du complément ;
- de fixer le C1q de la voie classique du complément et d'activer celui-ci (formation de la C3 convertase) ;
- de se lier à des structures de membranes bactériennes ;
- d'augmenter l'attraction des polynucléaires neutrophiles et la phagocytose.

Elle se lie de façon Ca^{2+} dépendante à la phosphocholine présente sur les cellules endommagées et celle présente sur les pathogènes. (Agrawal A., et al., 2002)

En résumé, elle permet la résistance aux infections bactériennes, l'élimination des cellules apoptotiques et nécrotiques, la restauration des tissus lésés et un effet pro-inflammatoire en favorisant l'activation des macrophages.

La CRP a également un effet inhibiteur sur la réponse immune (activité anti-protéase), principalement vis-à-vis des antigènes thymo-dépendants, afin d'éviter la prolongation des

phénomènes inflammatoires qui auraient des conséquences graves aussi bien locales que générales (désactivation des cellules, inhibition de la synthèse des médiateurs, disparition des phénomènes inflammatoires). En effet, la CRP a un effet inhibiteur sur la coagulation fibrinolyse et sur le système kallikréine/kinine via les fractions VIIIa et Va (thromboses multiples répétées si la coagulation prédomine, syndrome hémorragique si la fibrinolyse prédomine, lors d'une coagulation intravasculaire disséminée).

Une expérience menée en 1981 montre que l'administration passive de CRP humaine peut protéger des souris d'une injection létale de *Streptococcus pneumoniae*.

Une autre étude effectuée en 1995 sur un modèle de souris transgéniques surexprimant la CRP, infecté par le *Streptococcus pneumoniae*, montre que ces souris vivent plus longtemps et ont une mortalité plus basse que les souris non transgéniques également infectées. Cette résistance plus grande à l'infection est due à une réduction très importante de la bactériémie (). Cette même étude a également montré que les souris mâles survivent plus longtemps que les souris femelles. Cette différence peut être attribuée à une expression de la CRP supérieure par le mâle, qui est médiée par la testostérone.

L'étude menée en 1996 par Szalai montre que les effets protecteurs de la CRP contre une infection à *Streptococcus pneumoniae* sont médiés principalement par l'activation du complément mais que, même en absence du complément, la CRP garde une certaine action protectrice, probablement par opsonisation (Skalai A.J. et al., 2002).

2. La CRP, biomarqueur de risque indépendant de survenue de maladies cardiovasculaires

L'identification de la CRP en tant de biomarqueur de l'inflammation, à des concentrations plus faibles que celles mesurées lors de la phase aiguë, a permis d'étendre les études cliniques et de déterminer que cette protéine agissait également en qualité de biomarqueur de l'athérosclérose et de la survenue de complications. (Zethelius B. et al., 2008). De nombreuses études épidémiologiques prospectives ciblées chez des patients apparemment sains [], ou présentant un angor stable ou un syndrome coronaire aigu (Zhang Y.X., 1999), ou un infarctus myocardique ou un syndrome métabolique (Ridker P.M. et al., 2003) ont permis de démontrer un lien significatif entre un niveau basal de CRP élevé et le risque d'accident cardiovasculaire (Figure 10). Il a été également démontré que la concentration de CRP était corrélée avec le risque d'accident vasculaire cérébral ischémique [], la mort subite d'origine cardiaque [], l'arthériopathie périphérique [] et la resténose à la suite d'une angioplastie transluminale percutanée [].

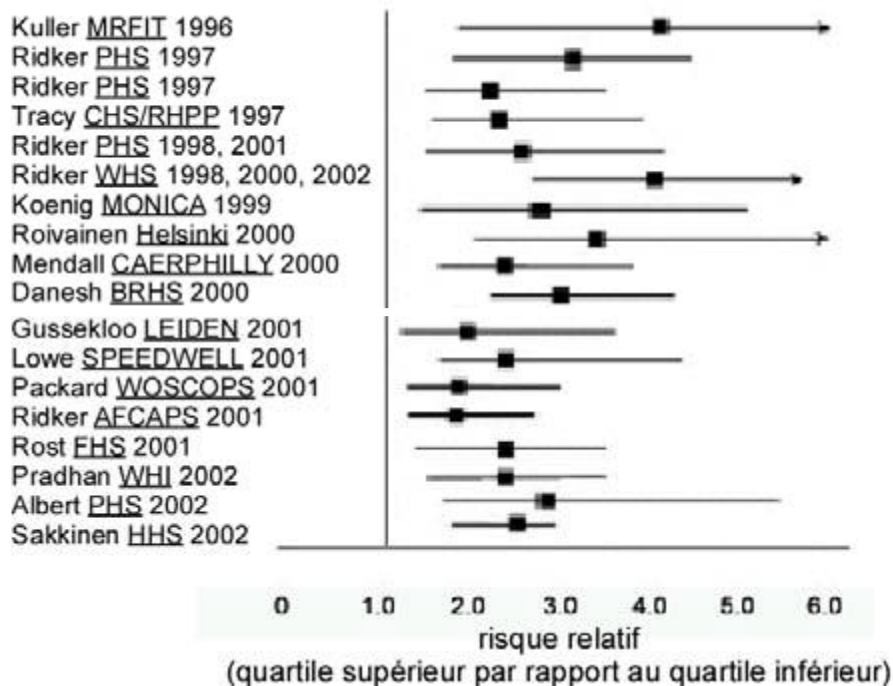


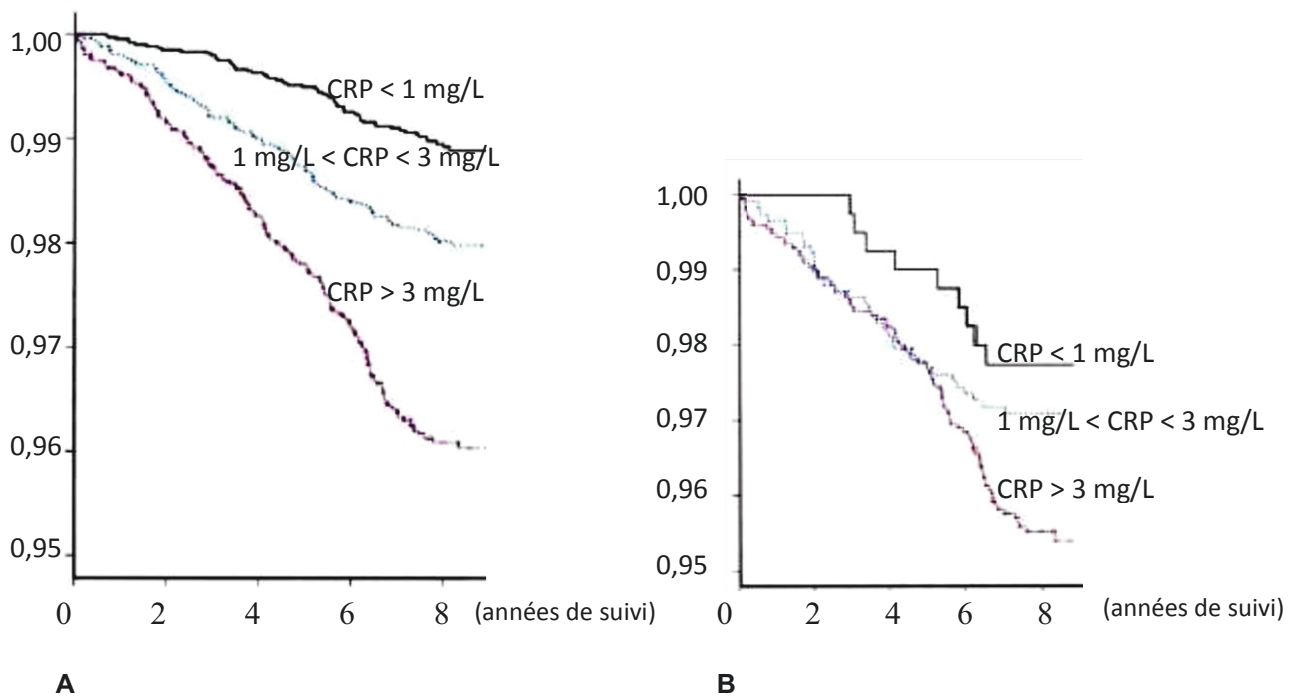
Figure 10 : Études prospectives depuis 1996 liant le niveau de CRP et le risque de survenue d'un premier événement cardiovasculaire respectivement dans le cadre d'accidents vasculaires cérébraux, de maladies coronaires, de maladies cardiovasculaires, d'infarctus du myocarde et de maladies artérielles pulmonaires selon l'étude.(Modifiée d'après Ridker, 2002)

Les techniques initiales de dosage de la CRP par immunoprécipitation avaient un seuil de sensibilité élevé (5 mg/L) mais qui restait acceptable pour la mise en évidence de la CRP en tant que marqueur de l'inflammation. L'acceptation de la CRP en tant que biomarqueur indépendant du risque cardiovasculaire et la mise au point du dosage ultra-sensible de la CRP (hsCRP) par des techniques ELISA ou de néphélométrie a permis de descendre le seuil de sensibilité (<0,2 mg/L) de la technique et ainsi définir 3 groupes [] :

- groupe à faible risque avec des niveaux en CRP < 1 mg/L
- groupe à risque modéré avec des niveaux en CRP compris entre 1 et 3 mg/L
- groupe à risque élevé avec des niveaux en CRP supérieur à 3 mg/L.

Les niveaux supérieurs à 10 mg/mL ne sont pas utilisés pour définir un risque de développer un accident cardiovasculaire car ces valeurs entrent dans un contexte inflammatoire.

Ces groupes ont été définis à partir de résultats d'études cliniques de mortalité ou de suivi de survenue d'événements cardiovasculaires sur plusieurs années. Il a été démontré qu'une concentration élevée en CRP est corrélée avec une augmentation du risque d'accident cardiovasculaire que les sujets soient sains ou non (Figure 11).



A **B**
Figure 11 : Corrélation entre la concentration en CRP plasmatique et le risque d'accident cardiovasculaire chez des sujets apparemment en bonne santé (A) ou présentant un syndrome métabolique (B). (Modifiée d'après Ridker, 2002)

Avant l'utilisation de la CRP comme marqueur prédictif, ce sont les taux de cholestérol plasmatiques (cholestérol total, LDL-cholestérol et HDL-cholestérol) que l'on prenait en compte pour évaluer le risque d'accident cardiovasculaire. Une classification avait été établie afin de lier les concentrations en cholestérol total, LDL-cholestérol et HDL-cholestérol avec une estimation du risque cardiovasculaire []. Cependant, un grand nombre d'événements cardiovasculaires n'ayant pas été associés à une hyperlipidémie [], la CRP a été préférée en tant que marqueur prédictif du risque cardiovasculaire (Brewer H.B., 2004) (Figure 12).

La CRP et les LDL ne sont pas les seuls marqueurs connus pour évaluer le risque d'événement cardiovasculaire. D'autres marqueurs de l'inflammation tels que le nombre élevé de leucocytes, le fibrinogène, les immunoglobulines sériques, les facteurs C3 et C4 du complément, l'amiloïde A sérique (SAA), l'interleukine 1 beta (IL-1 β) et son récepteur soluble (SIL-1R), l'IL-2, l'IL-6 (Biasucci L.M., et al., 1999 ; Ridker P.M., et al., 2000), l'IL-18, le facteur nécrosant des tumeurs (TNF α), les formes solubles des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 (Jager A. et al., 2000) et ELAM-1, la sélectine P et sélectine E, la sPLA-2, la phospholipase A2 associée aux lipoprotéines (Lp-PLA2), la néoptérine, la protéine A associée à la grossesse (PAPP-A), le ligand CD40 soluble, les métalloprotéinases matricielles 2 (MMP-2) et 9 (MMP-9) (Kai H. et al., 1998), certains antigènes de surface des leucocytes

ainsi que certains biomarqueurs de l'activation leucocytaire dont la myéloperoxydase (MPO) et le facteur tissulaire (TF) [] ont pu être associés à certaines pathologies cardiovasculaires ciblées, mais ne semblent pas avoir un pouvoir prédictif et une étendue aussi importants que la CRP.

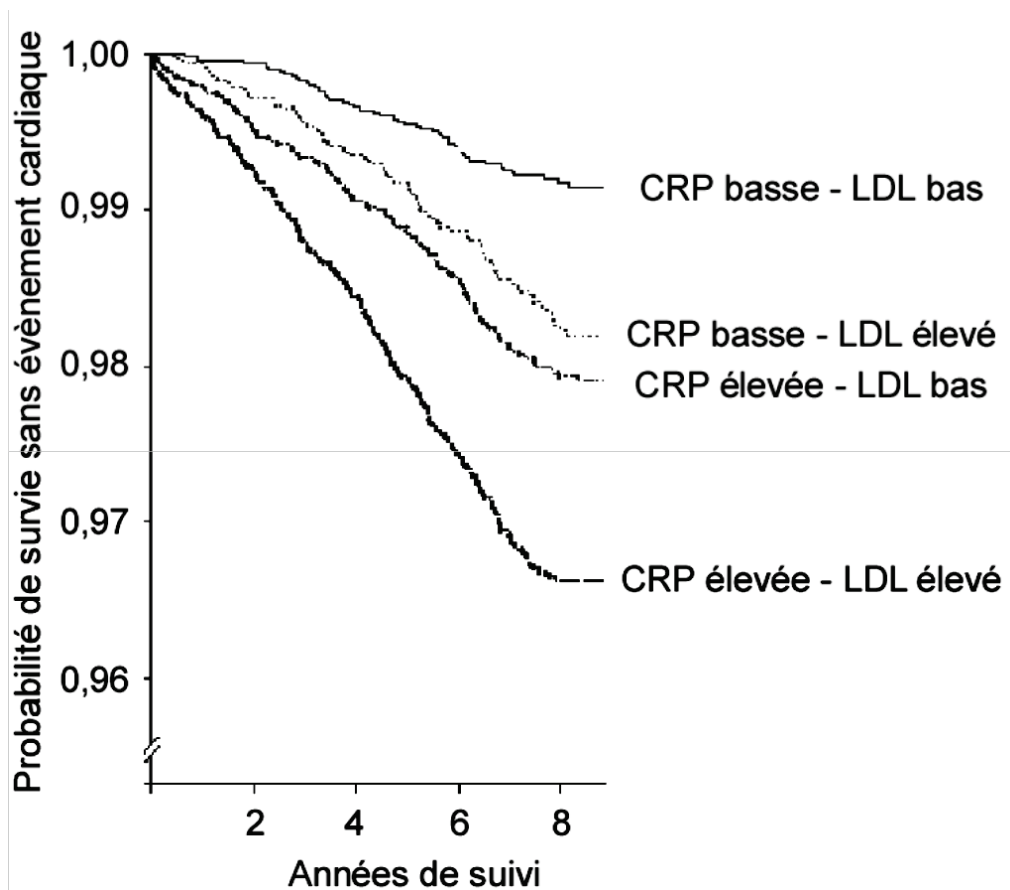


Figure 12 : Survie sans événement cardiovasculaire évalué en fonction des taux initiaux de CRP et de LDL. Modifié d'après Ridker, 2002. Quelque soit le niveau de LDL, une CRP élevée suffit à diminuer la probabilité de survie sans événement cardiaque. De plus, une CRP élevée couplée à un niveau élevé de LDL diminue de manière importante cette probabilité.

Par ailleurs, d'autres marqueurs ont été mis en évidence mais leur impact clinique est modeste. Parmi eux, l'homocystéine (Ridker P.M., et al., 2002), la lipoprotéine a (Lp(a)) [], l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) [], la troponine I ou T [], le peptide natriurétique de type B (BNP) [], ou encore certains biomarqueurs du stress oxydatif [].

La mesure simultanée de plusieurs de ces biomarqueurs, en général troponine Ic ou Tc (biomarqueurs de dommages myocardiques), peptides natriurétiques (biomarqueur de stress cardiaque), protéine C-réactive (biomarqueur d'inflammation systémique) et cystatine C (biomarqueur de dysfonction rénale) permettrait d'améliorer la prédiction de la survenue de

l'athérosclérose et de ses complications. Dans une étude récente, il a été montré que la prise en compte d'au moins deux de ces biomarqueurs prédisait significativement la survenue du décès chez des hommes d'âge moyen avec ou sans maladie cardiovasculaire au début de l'étude .

Ces résultats démontrent l'importance pronostique de l'élévation des biomarqueurs y compris chez des patients indemnes de toute pathologie cardiovasculaire. De plus, comme certains facteurs de risque (âge et sexe) ne sont pas modifiables, les biomarqueurs pourraient être utilisés pour la titration de certains traitements (par exemple les statines) dans le cadre de prévention des maladies cardiovasculaires. Il est pour cela nécessaire de documenter les mécanismes biologiques qui pourraient mettre en évidence une relation causale entre le biomarqueur et la survenue des complications cardiovasculaires, au-delà des relations statistiques entre concentration du biomarqueur et survenue des complications cardiovasculaires.

IV. Les microparticules endothéliales et applications en recherche clinique

1. L'endothélium vasculaire

1.1 Définition

Longtemps considéré comme un simple revêtement protecteur, l'endothélium vasculaire est aujourd'hui reconnu comme un organe multifonctionnel. Présent dans les vaisseaux de tous les organes, il permet le transport des substances nutritives, de diverses molécules actives et des cellules sanguines. De façon physiologique il contrôle l'homéostasie vasculaire grâce à la balance délicate entre vasoconstriction et vasodilatation, ainsi que prolifération et dégénérescence cellulaire. L'endothélium vasculaire joue un rôle capital par les facteurs vasoactifs qu'il libère, non seulement de régulateur du tonus vasculaire local à l'état basal, mais aussi en tant que partenaire dans la défense de l'intégrité de la paroi vasculaire.

Les cellules endothéliales tapissent la surface interne de la paroi vasculaire et forment ainsi une couche continue en contact avec le sang. Dans des conditions physiologiques l'endothélium fournit une surface thromborésistante qui permet le maintien de la fluidité du sang et prévient la formation du thrombus (). En réponse à une activation excessive celui-ci va subir des modifications et fournir un état prothrombotique après modification de l'expression de molécules anticoagulantes à la surface telle que la thrombomoduline, ou procoagulante comme le facteur tissulaire (FT) à l'origine de la formation de thrombine.

1.2 Implication de l'endothélium dans les réponses inflammatoires et immunologiques

Les cellules endothéliales font partie intégrante du système immunitaire. Deux types de contribution aux mécanismes de défense immunitaires peuvent être cités :

- Le recrutement non spécifique des leucocytes lors de réponses inflammatoires

Les cellules endothéliales expriment des molécules de surface capables d'orchestrer le trafic des leucocytes. Ces molécules qualifiées de molécules d'adhésion telles que l'E-selectine (CD62-E), ICAM-1 (pour *inter-cellular adhesion molecule*), VCAM-1 (pour *vascular cell adhesion molecule*), permettent à la cellule endothéliale, dans des conditions physiologiques, de diriger la migration des leucocytes vers des organes spécifiques, mais également d'accélérer le recrutement des leucocytes vers des tissus inflammatoires. Ces interactions leucocytes-endothélium sont essentielles à l'homéostasie vasculaire et au bon

déroulement de la réponse inflammatoire et immunitaire. Cependant, ces réactions d'adhésion peuvent, si elles sont insuffisamment contrôlées, conduire à l'installation de désordres inflammatoires et thrombotiques, et participer à diverses pathologies.

○ Le rôle dans l'immunité à médiation cellulaire

Les cellules endothéliales possèdent des marqueurs communs à la lignée monocyte/macrophage : expression de récepteur pour le fragment C1q du complément, récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines, expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II et peuvent se comporter comme des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Une expression constitutive des molécules du CMH de classe II est observée à la surface des cellules endothéliales microvasculaires. Les cellules endothéliales peuvent activer les lymphocytes T (LT) naïfs, induire leur prolifération et la sécrétion d'interleukine-2 (IL-2). Cette activation est dépendante d'un contact cellulaire impliquant la molécule de costimulation LFA-3 interagissant avec le CD2 présent sur les LT. Par ailleurs, les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques ont une capacité spécifique à présenter des antigènes (Ags) solubles exogènes présents dans la circulation à des LT CD4, et à induire la différenciation de ces LT CD4 et CD8 en cellules immunorégulatrices. Elles contribuent ainsi à l'induction de la tolérance immune. L'endothélium est également un composant actif de la réponse immune innée vis-à-vis de l'invasion bactérienne. Les cellules endothéliales sont en effet équipées de systèmes permettant la reconnaissance de déterminants exprimés par des agents pathogènes comme le lipopolysaccharide bactérien (LPS), et l'initiation consécutive de la transcription de gènes de molécules inflammatoires (). Elles ont également la faculté de produire diverses cytokines : IL-1, IL-6, IL-8, G-CSF (pour *granulocyte colony stimulating factor*), et GM-CSF (pour *granulocyte macrophage colony stimulating factor*).

L'endothélium peut aussi être la cible du système immunitaire. En effet, les cellules endothéliales jouent un rôle de premier plan dans le rejet en transplantation d'organes, à la fois comme actrices et comme cibles du rejet. Les cellules endothéliales du greffon sont donc les premières à interagir avec les cellules immunocompétentes du receveur et à recruter les lymphocytes et les macrophages qui vont relayer la réponse immunitaire contre le greffon. Les cellules endothéliales sont donc les premières cibles et victimes de cette réponse, humorale et cellulaire. La mise au point d'immunomodulateurs de la réponse immune permettant d'éviter « l'agression » des cellules endothéliales du greffon, et de protecteurs efficaces de l'endothélium, constituent donc une voie de recherche thérapeutique importante en transplantation d'organes.

2. Caractéristiques générales, origine et formation des microparticules (MPs)

La découverte des MPs circulantes découle de travaux datant du milieu du XX^{ème} siècle portant sur les propriétés de coagulation du sang humain, de son plasma et de ses principaux éléments figurés : plaquettes (Pq) et globules rouges (GR). En effet, alors qu'à cette période les plaquettes semblent être la clé majeure de la coagulation, certains émettent l'hypothèse qu'il puisse exister, au sein de la circulation sanguine, des substances pro-coagulantes encore non identifiées optiquement mais dont l'activité pourrait être démontrée expérimentalement. Ainsi en 1946, Chargaff et al. montrent que la suppression d'éléments isolés du plasma par une centrifugation à très haute vitesse engendre, *in vitro*, des troubles de la coagulation semblables à ceux de certaines pathologies hémorragiques héréditaires ou acquises (). Par la suite, Quick et al. poursuivent la caractérisation du phénomène en démontrant l'existence dans le sang circulant de matériel coagulant, dérivé des érythrocytes, et dont ils supposent la libération régulée selon la composition sanguine (). Parallèlement, O'Brien prouve que le sérum présente une activité de type plaquettaire et émet l'hypothèse qu'elle serait liée à la solubilisation d'un principe d'origine plaquettaire (). (Freyssinet et al., 2005 ; Morel et al., 2004) ;

Il faut toutefois attendre 1967 pour que Wolf montre la possibilité d'isoler des éléments infra-micrométriques, décrivant des plaquettes et présentant une activité pro-coagulante intrinsèque après ultracentrifugation plasmatique (plasma pauvre en plaquettes ou PPP) (Wolf et al., 1967). Il les baptise poussières plaquettaires (« platelet-dust ») et en présente les premières observations en microscopie électronique (Figure 13).

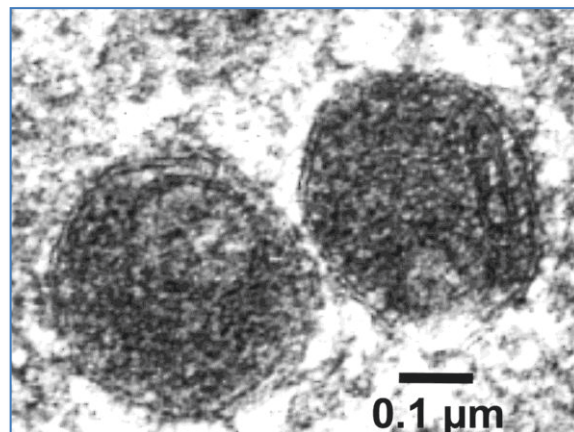


Figure 13 : Observation en microscopie électronique de microparticules circulantes de patients atteints de syndrome coronarien aigu. (D'après Drs Z. Mallat and M. Wassef, *Hypertension*, 2006).

De plus, il caractérise cette « poussière » en précisant son caractère riche en phospholipides, son existence en dehors de toute stimulation externe et sa relation linéaire avec le nombre de plaquettes présentes initialement dans les échantillons de sang. Par ailleurs, il suggère qu'elle ne provient pas d'un simple morcellement des plaquettes, mais bien d'un phénomène de libération sélective d'un fragment plaquettaire. Enfin, il ne peut isoler optiquement d'autres particules pouvant dériver de divers éléments figurés sanguins non plaquettaires.

Les travaux se sont poursuivis depuis ces premières étapes d'identification et, quarante ans plus tard, le terme de microparticules, ou microvésicules pour certains auteurs, ne se limite pas à la « poussière plaquettaire » de Wolf mais regroupe un très vaste panel d'éléments dont l'origine cytologique, la composition et les rôles physiologiques apparaissent très divers. Les prochains chapitres vont s'attacher à synthétiser ce qui est aujourd'hui connu à propos des MPs et plus particulièrement de celles ayant un lien avec l'athérosclérose.

2.1 Composition des microparticules

Comme nous allons le décrire dans les prochains chapitres, les MPs se forment à partir des membranes cellulaires. Pour mieux comprendre la structure des MPs, il convient donc, dans un premier temps, d'analyser la composition de la membrane d'une cellule humaine au repos avant de détailler les mécanismes connus de formation des MPs.

2.1.1 Structure membranaire et translocation des lipides

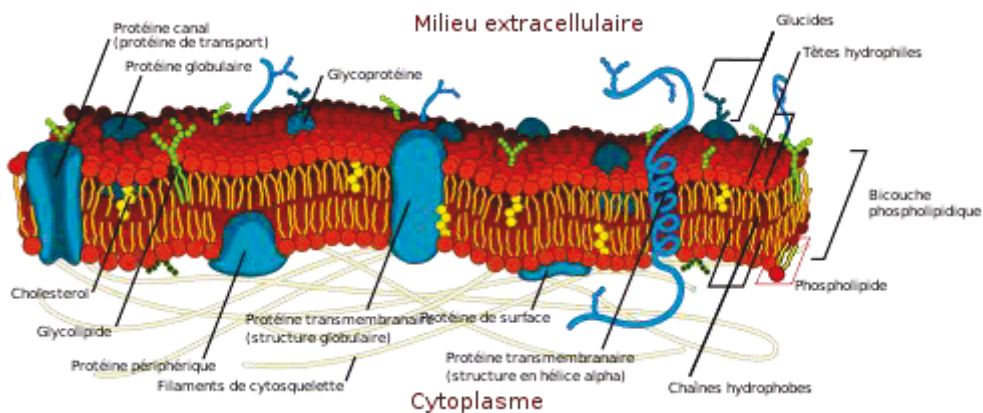


Figure 14 : Schéma d'une membrane cellulaire humaine vue en coupe transversale

Adapté de Wiegmann B. et Gerfelmeyer H. Membranen und osmose, 2006.

La structure des membranes cellulaires humaines, à l'instar de celles des autres cellules eucaryotes, repose essentiellement sur une bicouche de phospholipides où s'enchâssent différents éléments dont de nombreuses protéines (Figure 14). Cette bicouche se compose de deux feuillets : un feuillet interne, appelé cytoplasmique et un feuillet externe, dit plasmatique.

Les éléments constitutifs majoritaires de ces feuillets sont les phospholipides. Il s'agit de composés amphiphiles comprenant une partie hydrophobe, sous forme d'une ou plusieurs chaînes carbonées dérivées d'acides gras, liée par un résidu glycérol-phosphate à une partie hydrophile de nature variable. Structurellement, les phospholipides s'organisent de façon micellaire : les chaînes hydrophobes se font face et les pôles hydrophiles se répartissent de part et d'autre de la bicouche, permettant ainsi de séparer deux environnements aqueux distincts, le cytosol et le milieu extracellulaire. Cette organisation, en conjonction avec le gradient électro-chimique de membrane¹, permet également un contrôle des échanges entre les deux milieux en fonction des propriétés physico-chimiques des composés et de leurs affinités pour les protéines de transport ().

Chimiquement, on distingue deux groupes majoritaires de phospholipides au sein de la membrane cellulaire : les phosphoacylglycérols et les phosphosphingolipides. Les principaux constituants membranaires d'une cellule humaine typique (par exemple une cellule endothéliale) sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE) appartenant au groupe des phosphoacylglycérols auxquels s'ajoute la sphingomyéline (SM) du groupe des phosphosphingolipides.

Leur répartition dans la membrane est asymétrique () et varie d'un type cellulaire à l'autre (Morel et al., 2004). Il est à présent admis que le feuillet plasmatique de la membrane se compose majoritairement de SM et de PC alors que PS et PE sont retrouvées essentiellement sur le feuillet cytoplasmique.

Cette asymétrie membranaire est entretenue par des phénomènes de transport actif, dits de translocation, nécessitant la consommation d'énergie produite par hydrolyse d'adénosine triphosphate (ATP) (). Ce phénomène découvert dans les membranes érythrocytaires a été, par la suite, démontré pour les autres types cellulaires (). Pour maintenir cette asymétrie, trois structures membranaires permettant la translocation des lipides : on les nomme généralement flippase, floppase et scramblase (Figure 3).

¹ Il existe une différence de composition ionique entre le cytosol et le milieu extra-cellulaire entretenue par différents mécanismes de transport (pompes énergie dépendante, canaux, co-transporteur...). Le milieu extracellulaire est ainsi chargé positivement par rapport au cytosol, créant une différence de potentiel et un gradient électrochimique.

a) Flippase

Egalement appelée « aminolipide translocase », la flippase permet uniquement le transfert aminophospholipides (PS et PE) vers le feuillet cytoplasmique. Elle effectue ce transport contre le gradient de concentration intra-membranaire en consommant de l'ATP, comme le prouvent les études réalisées avec des inhibiteurs des ATPases (). Ces expériences suggèrent que chez l'Homme, une ATPase de type P présentant une activité ATPasique dépendant du magnésium, serait impliquée dans cette translocation. Toutefois, le concept de flippase ne peut être résumé à cette seule ATPase dépendante du magnésium. En effet, l'expérimentation chez les levures a montré qu'il existait sur un même genre de levure au moins 5 types d'ATPase de type P impliqués dans l'asymétrie membranaire (). Chez l'être humain, le problème apparaît encore plus complexe car il existerait au moins 14 gènes codant pour des ATPases de type P, et l'expression de ces gènes varierait selon le tissu étudié ().

b) Floppase

La floppase permet le transfert vers le feuillet plasmique d'une membrane cellulaire de la PS, de la PE, mais aussi de la PC et de la SM. Il s'agit, là aussi, d'un phénomène consommant de l'énergie sous forme d'ATP pour aller contre le gradient de concentration intra-membranaire (). Cette fonction est assurée, entre autre, par certaines protéines de la superfamille des ATP-Binding Cassette transporteurs (ABC) (). Si elles ne semblent pas les seules assignées à ce transport chez les eucaryotes, elles sont, à l'heure actuelle, les mieux étudiées.

c) Scramblase

Quelle qu'en soit la nature exacte, la « scramblase » n'a toujours pas été isolée. Toutefois, son rôle est bien défini. Il consiste en un mouvement bidirectionnel et s'applique à la très grande majorité des phospholipides. Donc, contrairement à la flippase et à la floppase, la scramblase ne possède aucune propriété relative à l'asymétrie lipidique membranaire mais joue, bien au contraire, un rôle de désorganisation de cet équilibre. Il est bien établi que ce phénomène ne s'initie que sous l'influx de Ca^{2+} intracellulaire qui doit être maintenu tout au long du processus ().

A ce jour, tous ces mécanismes ne sont pas encore compris dans leur intégralité mais, en résumé, la flippase et la floppase sont constamment actives dans la cellule au repos pour y maintenir l'asymétrie lipidique membranaire alors que la scramblase dégrade ponctuellement et rapidement cette organisation.

Nous allons à présent examiner les signaux à l'origine de cette déstructuration et la nature et le potentiel des MPs qui en découlent.

2.2 Genèse des microparticules

La production de MPs dans l'organisme survient au décours de deux phénomènes distincts : l'apoptose et l'activation cellulaire. Alors que le renouvellement cellulaire se poursuit dans la majorité des tissus jusqu'à la fin de vie d'un individu, l'apoptose, également appelée mort cellulaire programmée, correspond au principe d'élimination des cellules sénescents permettant d'obtenir une homéostasie au sein des divers organes. L'activation cellulaire survient, elle aussi, de façon contrôlée et ce, dès qu'une cellule est stimulée afin d'effectuer une action complémentaire à celles déjà exercées au repos.

Au cours de ces deux phénomènes, la membrane cellulaire est remaniée et la situation d'asymétrie lipidique décrite dans notre premier chapitre se modifie. Il se déroule alors à la surface des cellules un procédé nommé vésiculation à l'origine de l'émission des MPs (Figure 15, Piccin et al., 2007). Ce phénomène de libération est l'aboutissement d'une chaîne de réactions que nous allons maintenant décrire.

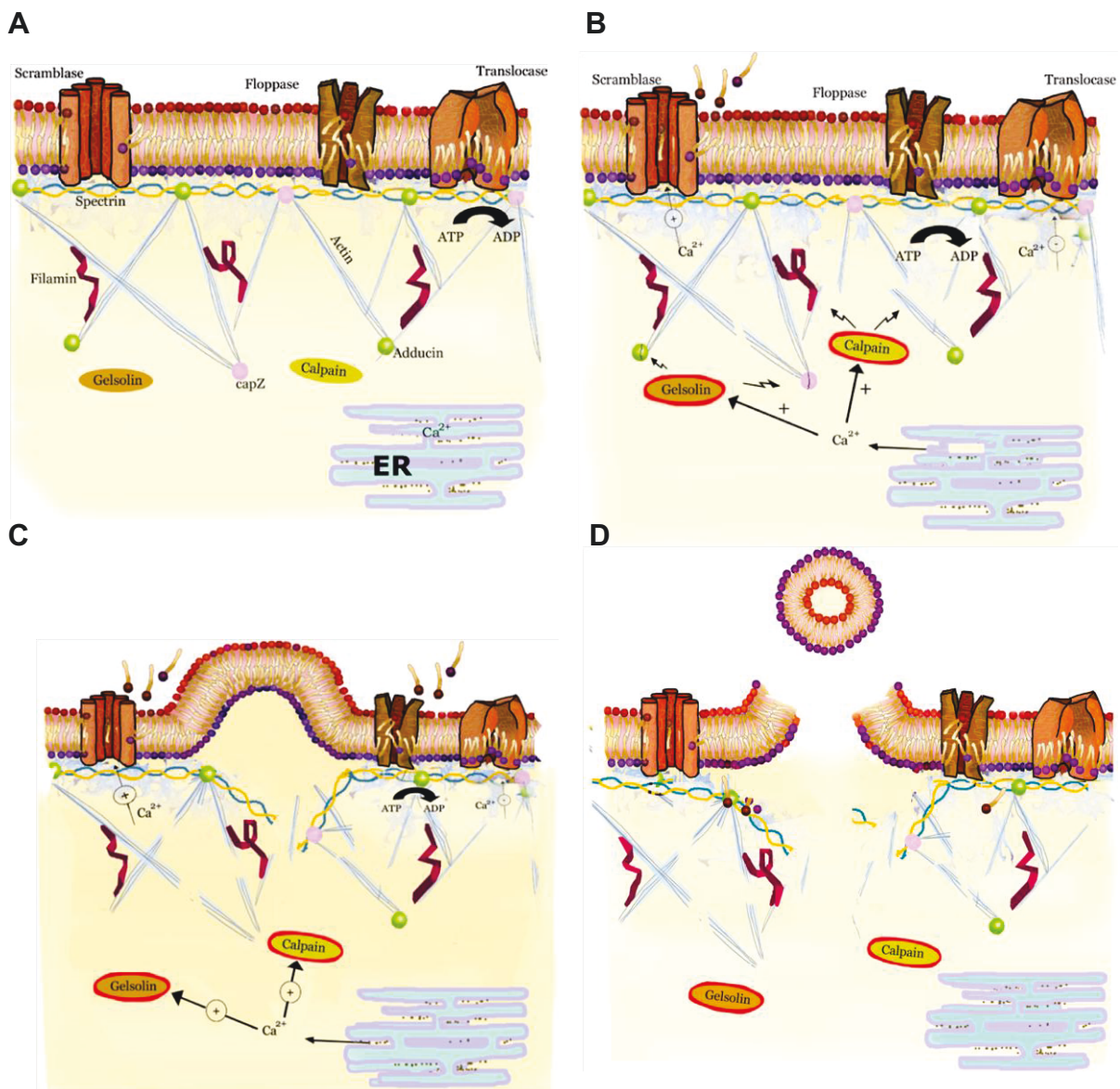


Figure 15 : Schéma de la formation et de la libération des MPs

A : L'asymétrie membranaire est maintenue grâce aux protéines de transport des phospholipides ; **B** : L'activation cellulaire conduit à une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire activant la Calpaïn et la Gelsolin. La Calpaïn clive les filaments d'actine, la Gelsolin clive les protéines de coiffe des filaments d'actine. L'augmentation du calcium intracellulaire conduit également à l'activation de la scramblase et l'inhibition de la translocase. Il y a perte de l'asymétrie membranaire ; **C** : Suite à l'activation cellulaire, il y a clivage du cytosquelette et des protéines de liaison du cytosquelette à la cellule, induisant le bourgeonnement de la membrane ; **D** : Génération de MPs exposant une surface riche en PS. (Piccin, 2007)

2.2.1 Les stimuli de la production des microparticules

De très nombreux agonistes peuvent induire la libération de MPs suite à l'activation ou à l'apoptose cellulaire. Par exemple, les cellules endothéliales, les monocytes, les hépatocytes ou encore les cellules musculaires lisses libèrent des MPs lorsque certains de leurs récepteurs membranaires entrent en contact avec des dérivés lipopolysaccharidiques bactériens, le complexe C5b-9 (complexe terminal du complément), des cytokines... (). De même, l'activation des plaquettes via le complexe C5b-9, la thrombine ou le calcium ionophore A23187 génère une production de MPs (Hugel et al., 2005).

En ce qui concerne l'apoptose, les possibilités d'induction sont multiples. On pense à l'heure actuelle qu'il existe trois voies de déclenchement distinctes mais possédant des cascades de réactions entrelacées. Ainsi, on distingue la voie extrinsèque médiée par les récepteurs plasmatiques (au $TNF\alpha$, aux interleukines,...), la voie intrinsèque utilisant les mitochondries (suite à la stimulation par des radiations, l'hypoxie,...) et enfin la voie cytotoxique dérivant de l'action des lymphocytes T au niveau des perforines de membrane ().

Une fois qu'une cellule ou une plaquette reçoit l'un ou l'autre de ces stimuli, des cascades de réactions se déroulent au sein du cytoplasme. L'une de ces réactions, souvent préliminaire, va retenir particulièrement notre attention : l'accroissement de la concentration en calcium dont découlent les phénomènes à l'origine de la libération de MPs circulantes (Boulanger et al., 2006).

2.2.2 Phénomènes présidant à la « naissance » des microparticules

L'élévation de la concentration cytosolique en « calcium », sous forme d'ions Ca^{2+} , représente l'élément clé de la formation des MPs. Le calcium est libéré dans le cytosol à partir du réticulum endoplasmique. Son rôle au niveau du hyaloplasme (cytosol et cytosquelette) et de la membrane cellulaire va dépendre du type cellulaire concerné et du signal inducteur.

Au sein des plaquettes, cette augmentation du Ca^{2+} cytosolique va permettre l'activation de la gelsoline. Il s'agit d'une protéine plaquettaire spécifique qui permet de mouvoir les protéines de cape situées en position terminale des filaments d'actine constituant

le cytosquelette plaquettaire. Les filaments ainsi mis à nu vont être remaniés et les plaquettes vont se contracter avant de libérer des MPs () (Figure 15).

Dans les plaquettes et les autres types cellulaires, l'augmentation de la concentration de calcium cytoplasmique va activer une autre enzyme, la calpaïne. Ses rôles sont multiples dans la genèse des MPs. Elle va permettre notamment de découper les filaments d'actine ou encore de détruire la taline, un autre constituant du cytosquelette. Dans les phénomènes d'apoptose, elle induit, entre autre, *via* des effecteurs tels que des caspases, Bcl-XL, ROCK I, les contractions cellulaires ou encore la fragmentation de l'ADN (). Mais surtout, en ce qui concerne notre sujet, la calpaïne activée va faciliter la séparation des MPs depuis la membrane cellulaire (Figure 15).

En plus des modifications du hyaloplasme, l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} perturbe l'équilibre lipidique de la surface cellulaire. En effet, le Ca^{2+} va ainsi inhiber la flippase et accroître l'activité de la scramblase. L'équilibre lipidique est alors rompu. La sommation de ce phénomène à la déstructuration du hyaloplasme entraîne une vésiculation membranaire puis la libération de MPs (Figure 15).

Si l'on insiste beaucoup sur le phénomène de majoration de la concentration du calcium cytoplasmique, c'est qu'il a été montré que la séquestration du calcium extracellulaire par l'adjonction d'EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid – acide tétra-acétique éthylène glycol), empêche l'élévation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire mais surtout bloque le relargage de MPs dans les liquides biologiques (). Ainsi la variabilité de la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique joue un rôle majeur dans la libération des MPs quelque soit le type cellulaire étudié.

2.2.3 Des microparticules variables d'une « cellule mère » à l'autre

Les derniers paragraphes montrent bien que le principe de formation des MPs est schématiquement identique quel que soit le type de cellule à l'origine de leur production. On peut le résumer par l'enchaînement suivant :

- 1- réception d'un signal de stimulation ou d'apoptose,
- 2- élévation du calcium cytoplasmique avec déformation de la membrane,
- 3- émission des MPs.

Toutefois, malgré un processus de formation commun, toutes les MPs ne présentent pas une composition et une structure identiques.

La membrane d'une MP se compose d'une infime portion de la membrane de la cellule dont elle est issue (« cellule mère »). De façon analogue, une partie du cytoplasme de la « cellule mère » est emportée par la MP circulante. Lorsqu'on analyse une MP, on y retrouve logiquement des antigènes de surface caractéristiques de la membrane « mère » et des constituants cytosoliques avec parfois même des fragments d'ADN pour les MPs originaires de cellules apoptotiques (). Cependant, cette composition antigénique varie en fonction du type cellulaire et des circonstances physio-pathologiques. (Figure 16)

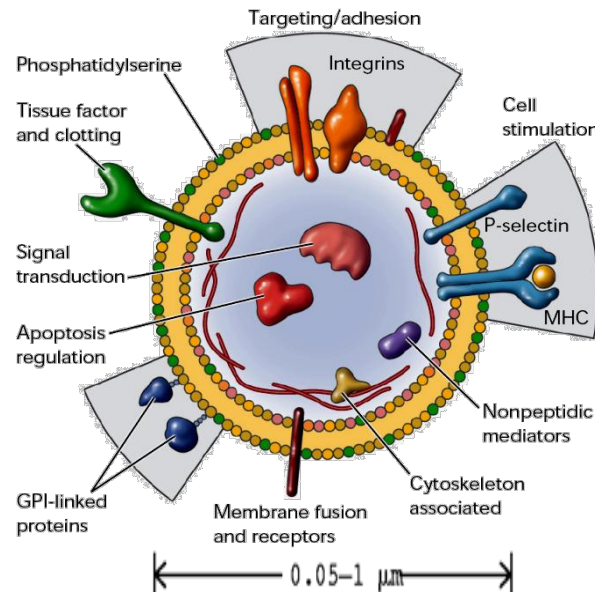


Figure 16: Structure prototypique des MPs

MPs cellulaires : un véritable pool de bioeffecteurs.

Les MPs sont libérées par la membrane plasmique des cellules stimulées. Elles présentent au sein de la membrane des protéines cytoplasmiques, ainsi que des lipides bioactifs impliqués dans de nombreux processus cellulaires. Cette représentation n'est pas exhaustive, en ce qui concerne les différents composants représentés. MHC : complexe majeur d'histocompatibilité ; GPI : glycosylphosphatidylinositol (Hugel, 2005).

Ainsi, pour un même type de cellule, la composition lipidique et les types d'antigènes de surface des MPs varient selon le stimulus à l'origine de la formation des MPs. Par exemple, pour des MPs d'origine endothéliale, alors qu'un stimulus inflammatoire donne des MPs riches en E-sélectine (protéine membranaire nécessaire au « rolling » des leucocytes² sur l'endothélium vasculaire), une stimulation apoptotique engendre des MPs riches en CD31 (protéine membranaire des cellules endothéliales) (Abid Hussein, 2008). Cette différence de composition des MPs issues d'un même type cellulaire se note également, pour des agonistes différents visant à un même type d'activation, voire même pour un agoniste identique ().

² Le « rolling » provient d'une liaison faible entre des récepteurs membranaires des leucocytes circulants et la E-selectine présente sur le versant vasculaire des cellules endothéliales. Par ce procédé, les leucocytes sont freinés et maintenus à proximité de l'endothélium vasculaire où ils se fixeront par le biais d'autres protéines d'adhésion.

Il a aussi été montré que les MPs issues d'un type cellulaire n'exprimaient pas tous les marqueurs spécifiques de leur « cellule mère », y compris les plus abondants (Jimenez et al., 2005). A l'inverse on peut observer, en surface des MPs, une concentration bien plus élevée de certains antigènes par rapport à la densité notée dans la population « mère » (Lynch, 2007).

De même, après leur libération, les MPs sont à même de transmettre ou d'acquérir d'autres marqueurs dont certains n'existent pas sur la membrane de la « cellule mère » ().

Ainsi, la genèse des MPs résulte d'un processus complexe et très contrôlé aboutissant à des populations très différentes. Ces caractéristiques structurales et cette hétérogénéité des MPs, dans les tissus comme dans le sang circulant, ont deux implications pratiques principales :

- par leurs composants protéo-lipidiques, les MPs peuvent atteindre des cibles diverses et transmettre des messages complexes et variables leur conférant un rôle primordial de bioeffecteur dont les conséquences physio-pathologiques sont probablement majeures.
- les techniques modernes enzymatiques et immunologiques mettent à profit les potentiels biologiques et les caractéristiques antigéniques des MPs et permettent, en laboratoire, de les isoler, de les analyser et de les quantifier au sein des liquides biologiques.

3. Microparticules endothéliales, nouveaux marqueurs biologiques

Parce qu'elles régulent l'homéostasie vasculaire, les microparticules endothéliales peuvent représenter de nouveaux marqueurs de maladies vasculaires. Les microparticules sont détectables dans le sang circulant de sujets sains. Certaines pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires à risque thrombotique accru, sont associées à des taux élevés de microparticules, ce qui confère à ces dernières un potentiel rôle pronostique. Ainsi, des élévations de taux de microparticules endothéliales ont été décrits dans les syndromes coronariens aigus, les accidents vasculaires cérébraux, le diabète, le syndrome métabolique, l'hypertension, le purpura thrombotique thrombocytopenique, le syndrome des antiphospholipides, le lupus anticoagulant, les vascularites, l'insuffisance chronique veineuse, l'hémoglobinurie paroxystique nocturne, et potentiellement toutes les situations définies par une dérégulation des réponses inflammatoires et homéostatiques (Freyssinet et al., 2005).

Les niveaux élevés de microparticules endothéliales sont également associés à la plupart des facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'obésité, l'hypertension, le diabète, et semblent être prédictifs d'un pronostic clinique péjoratif (Ardoin et al., 2007). A l'avenir, la mesure des taux de microparticules endothéliales offrira donc de nouvelles perspectives pour

évaluer le risque vasculaire. Cependant, la mesure des microparticules endothéliales demeure un défi technique en raison de l'absence de standardisation. En effet, plusieurs variables préanalytiques telles que le prélèvement de sang, le traitement des échantillons, le transport et la centrifugation peuvent avoir un impact majeur sur la mesure des microparticules. De plus, la mesure par cytométrie en flux présente certaines limites comme le seuil de détection de la taille des microparticules. En outre, le choix des anticorps spécifiques contre les antigènes endothéliaux est essentiel pour la quantification des microparticules endothéliales dans des contextes pathologiques (Michelsen et al., 2009). Par conséquent, l'élaboration de protocoles standardisés pour la mesure des microparticules endothéliales est une condition préalable à la définition complète de leur intérêt clinique en tant que marqueurs pronostiques. Un autre point critique, toujours controversé, est de savoir si l'élévation des microparticules endothéliales peut être considérée comme une cause ou une conséquence des maladies (Lynch et al., 2007). Enfin, la reconnaissance des microparticules endothéliales en tant qu'effecteurs biologiques dans différentes pathologies offre de nouvelles perspectives pharmacologiques. En effet, plusieurs stratégies thérapeutiques ciblées sur les maladies vasculaires ont également montré le bénéfice lié à une réduction significative des taux de microparticules circulantes (Boulanger et al., 2006).

C- MESURE IN VITRO DE LA CONCENTRATION DES PRE- β HDL (Projet n°1)

Bien qu'il y ait des preuves convaincantes que les pre β -HDL jouent un rôle très important dans le transport retour du cholestérol (RCT), les données sur la mesure des pre β -HDL dans le plasma sont limitées et controversées (). Tel que discuté auparavant, c'est en partie à cause des différences dans les techniques utilisées pour la quantification de ces particules, mais aussi en raison du manque d'une classification bien définie des particules de pre β -HDL. A l'heure actuelle, les concentrations des pre β -HDL peuvent être mesurées par différentes méthodes, y compris l'électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE), l'immuno-électrophorèse, la chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HP-SEC), et la méthode immuno-enzymatique (ELISA) ().

I- Rationnel et objectif de l'étude sur la stabilité des pré- β HDL

Dans cette partie, nous décrivons une méthode de stabilisation des pré- β HDL, et évaluons la performance du 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB). La stabilité des pré- β HDL a été évaluée en mesurant les concentrations des pré- β HDL dans les plasmas stockés sur glace à différents temps. Le rôle de la LCAT dans la régulation de la concentration des pré- β HDL a été évalué en incubant les plasmas sur glace avec ou sans l'inhibiteur de la LCAT : DTNB (2 mmol/L).

Un grand nombre d'études a démontré qu'un niveau élevé de HDL-cholestérol est un facteur de risque négatif pour la maladie coronarienne. Les concentrations de pré- β HDL sont actuellement mesurées dans quelques laboratoires par gel d'électrophorèse natif en deux dimensions (2D). Cette méthode n'est pas bien adaptée pour une utilisation répandue dans les laboratoires cliniques, car elle est coûteuse, longue, et nécessite de nombreuses compétences techniques. L'autre obstacle rencontré en laboratoire est que les pré- β HDL lors du stockage sont instables, donc les analyses doivent être effectuées uniquement sur des échantillons de plasma frais.

II- Matériel et Méthodes

1. Protocole d'étude

L'apo AI dans les particules β et α -HDL peut être quantifiée par immunoelectrophorèse. Dans un premier temps, une électrophorèse non dénaturante, basée sur la charge électrique, est réalisée à travers d'un gel d'agarose. La seconde étape est l'immunodétection sur une membrane de PVDF en contact d'un anticorps de mouton anti-apo AI humaine. Les complexes antigènes-anticorps sont visualisés avec une solution substrat de phosphatase alcaline (BCIP/NBT). Les proportions d'apo AI dans les régions β et α sont quantifiées par la méthode d'imagerie et calculées à partir d'apo AI de plasma total.

Les pré-bêta HDL ont été analysées selon la méthode de Fredrickson et Lees (1965) par électrophorèse sur gel d'agarose et transférés sur une membrane par capillarité. La membrane est séquentiellement incubée avec un anticorps anti-apo AI humaine de mouton puis avec un conjugué anti-IgG mouton de souris phosphatase alcaline. La coloration obtenue par l'activation de la phosphatase alcaline en présence d'une solution de substrat actif BCIP/NBT apparaît sur la membrane de PVDF ; et la bande pré-bêta HDL est quantifiée par densitométrie. Le dosage est calibré à l'aide d'un standard obtenu à partir d'un pool de sérums humains, avec une concentration de 0,38 g / L en particules LpAI.

2. Matériel

Le 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB) a été acheté auprès de Chem Supply (Australie). Les systèmes de gels d'électrophorèse des lipoprotéines (Titan gel lipoprotein) ont été obtenus à partir de Helena Laboratories (Etats-Unis) et la chambre d'électrophorèse K20 de Sebia (France). Les ImmobilonPSQ transfert polyvinyléne difluoride (PVDF) 0,2 μ m membranes ont été obtenues chez Millipore (Etats-Unis). L'anticorps anti-apo AI humaine de mouton a été fourni par Roche (Etats-Unis). Le conjugué anti IgG mouton de souris phosphatase alcaline a été obtenu chez Sigma-Aldrich (Etats-Unis). Les réactifs pour la détection de la phosphatase alcaline (BCIP/NBT), ont été obtenus sous forme de kit, par Invitrogen (Etats-Unis).

3. Echantillons

Les échantillons de sang (4 ml) ont été recueillis auprès de sept bénévoles, à notre centre de recherche médicale. Cette étude a été réalisée sur des sujets normolipidémiques. Tous les sujets ont été informés et ont signé un consentement avant d'entrer dans cette étude.

Le sang veineux a été prélevé à partir de sujets à jeun pendant au moins 12 h. Les échantillons de sang ont été recueillis dans des tubes EDTA (0,1%), et immédiatement conservés sur glace. Les inhibiteurs de la LCAT, le DTNB et le mélange phénylméthylsulfonyl (PMSF)/benzamidine ont été ajoutés directement après prélèvement sanguin ; et utilisés à des concentrations finales de 2 mmol/L pour le DTNB et 1 mM pour le PMSF et la benzamidine. Ensuite, les plasmas ont été obtenus par centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min à 4 ° C, et maintenu sur la glace jusqu'à l'électrophorèse, qui a été réalisée dans les 7h après le prélèvement.

4. Méthodes

4.1 L'électrophorèse

Les échantillons de plasma ou les standards (2 µL) ont été placés dans les puits et l'électrophorèse horizontale a été réalisée en utilisant un kit de gels d'électrophorèse des lipoprotéines et une chambre d'électrophorèse K20. Les pré-β-HDL ont été isolées du plasma par électrophorèse sur gel contenant 0,6% d'agarose et 3% de saccharose effectué à une tension de 60 V constant pendant 40 min dans le tampon barbital sodique (pH 8,6). Après l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF et soumis à l'analyse par Western blot avec un anticorps anti-Apo-AI polyclonal (Roche).

4.2 Immunoblot.

4.2.1 Transfert passif des protéines

Une membrane de PVDF a été immergée dans du méthanol 100% et lavée à l'eau distillée. Le gel a été superposé, une nuit à 4 ° C, sur la membrane PVDF, recouvert de deux feuilles de papier Whatman, et une feuille de plastique. Ensuite, la membrane a été séparée du gel.

4.2.2 Fixation, blocage et immunodetection

Pour fixer les protéines à la membrane, les membranes ont été traitées avec un tampon phosphate salin (0,01 M phosphate de Na, 0,145 M de NaCl, pH 7-PBS), incubées dans le PBS contenant 0,03% de glutaraldéhyde dans un récipient en plastique, puis agitées pendant 10 min à température ambiante. Après la fixation, les membranes ont été rincées deux fois avec du PBS pour éliminer le glutaraldéhyde résiduel. La capacité de couplage des protéines libres à la membrane a été bloquée par une incubation de 2 heures dans du PBS contenant 0,05% de Tween 20 (PBST) avec du lait écrémé 5%, sous agitation continue. Les apolipoprotéines sont détectées par une incubation d'une nuit avec un anticorps polyclonal de mouton anti apoA-I humaine (Roche, dilution au 1:10 000) dans le lait 5% dans le PBST, sous agitation continue. Après incubation avec l'anticorps primaire, les membranes sont lavées trois fois pendant 10 min dans du PBST. Les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de chèvre purifié chez le lapin et conjugué à la phosphatase alcaline dans le même tampon (Sigma, dilution 1:10 000). Les membranes ont été incubées pendant 2 h, suivi de quatre lavages de 10 min chacun, dans le PBST. Les bandes de protéines ont été révélées avec la solution préparée extemporanément de BCIP/NBT. Brièvement, les membranes ont été immergées dans cette solution substrat de phosphatase alcaline (BCIP/NBT) jusqu'à ce que la couleur apparaisse (2-3 minutes), puis les membranes sont immédiatement transférées dans une solution d'acide acétique à 10% afin de stopper la révélation. Puis les membranes ont été rincées à l'eau.

Les membranes séchées ont été scannées, en mesurant la densitométrie, sur le système d'imagerie FluorChem FC2 avec un filtre de 590 nm et ont été analysées avec le logiciel AlphaView de Cell Biosciences (Etats-Unis). La détermination de la taille des différentes bandes révélées, a été réalisée grâce à des standards internes et des particules avec mobilité pré- α dont les tailles sont connues.

4.2.3 Normalisation.

Afin d'uniformiser les différents tests, le même sérum standard a été déposé sur chaque gel tout au long de l'étude. Chaque gel a été soumis à l'électrophorèse et transféré sur une membrane de nitrocellulose. Toutes les membranes ont été traitées dans des conditions identiques. Chaque membrane a été quantifiée, comme décrit ci-dessus, et l'intensité moyenne a été calculée.

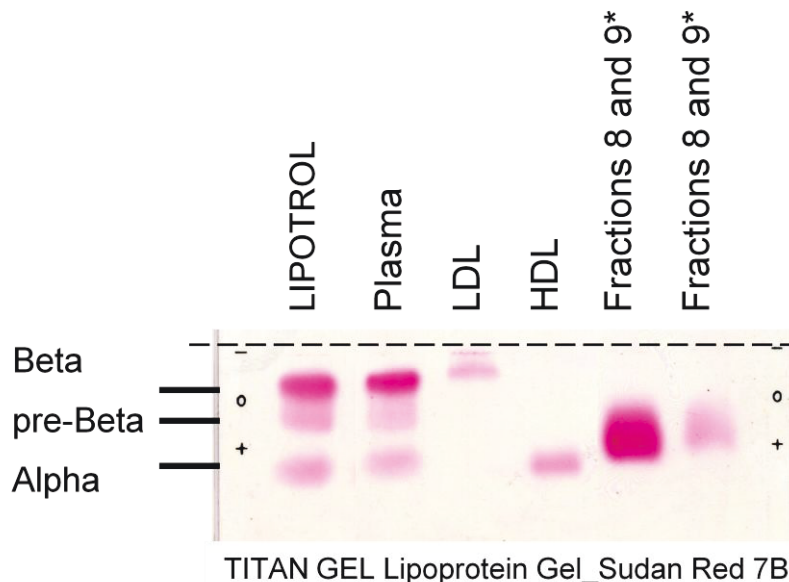
III- Résultats et Discussion

1. Résultats

1.1 Localisation des pré-β HDL

La bande de lipoprotéines α HDL est la fraction avec la plus rapide mobilité et qui se situe le plus près de l'anode. La bande des β -lipoprotéines (LDL) est généralement la fraction la plus prédominante et est près de l'origine, migrant seulement légèrement de l'anode au point d'application de l'échantillon. La bande des pré- β lipoprotéines (VLDL) migre entre les lipoprotéines Alpha et Bêta. La mobilité des pré- β lipoprotéines varie selon le type de pré- β présentes, et le pourcentage des β lipoprotéines présentes. Parfois les pré- β seront observés comme une traînée devant la fraction. D'autres fois, celles-ci peuvent être divisées en deux ou plusieurs fractions ou peuvent être totalement absentes. L'intégrité de la fraction pré- β diminue avec l'âge de l'échantillon.

Pour nos analyses nous avons utilisé le système d'électrophorèse des lipoprotéines de Helena Laboratories (Titan Gel Lipoprotein), qui permet à la séparation et la quantification des lipoprotéines plasmatiques par électrophorèse en gel d'agarose.



*Fractions 8 and 9 are prebeta AI and alpha AI

- Lipotrol (Cat. No. 5069) est un échantillon contrôle dans lequel la concentration relative en lipoprotéines sont: alpha (33%), pré-bêta (23,6%) et bêta (43,4%). La bande correspondante à la Lp(a) peut apparaître entre les bandes pré-bêta et alpha.

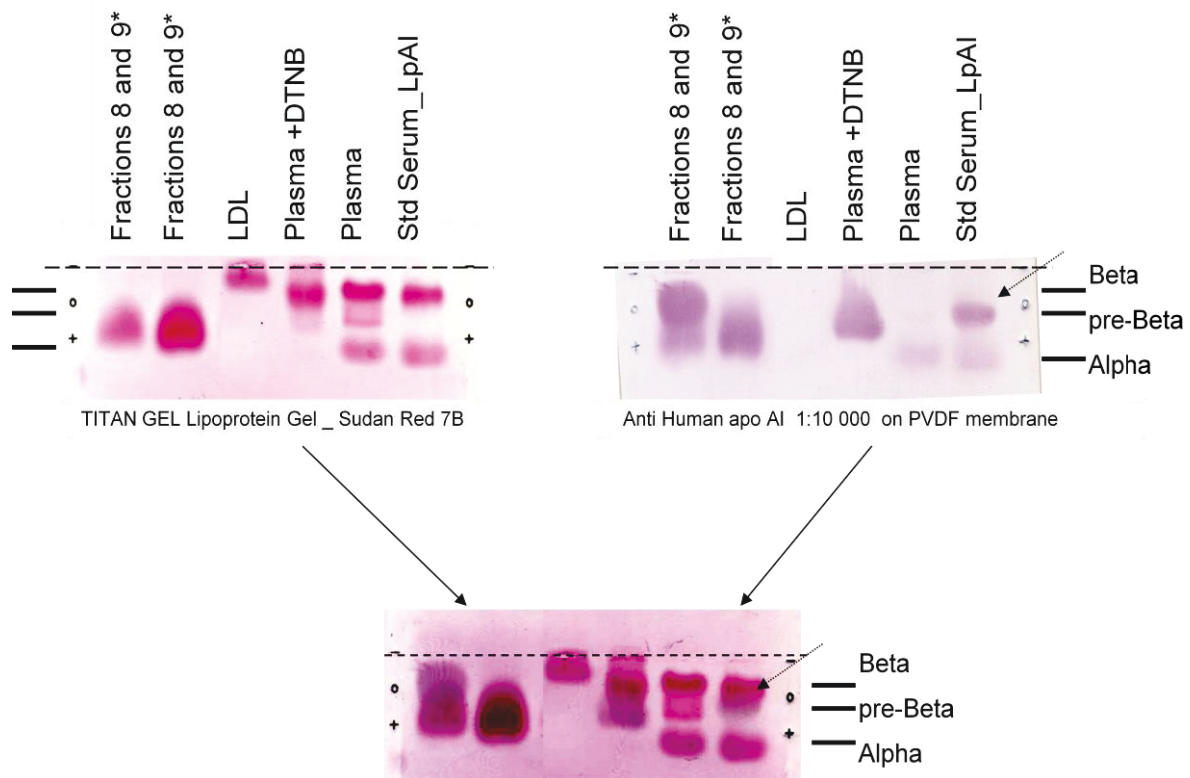
Figure 17 : Résultats obtenus illustrant la position des pré- β HDL après la migration et la coloration au rouge Soudan 7B du gel d'agarose (Titan Gel Lipoprotein Electrophoresis System Cat. No. 3045).

Les fractions de lipoprotéines sont séparées par électrophorèse puis colorées avec une solution de coloration rouge Soudan 7B. Les bandes colorées peuvent être observés visuellement pour des résultats qualitatifs ou peuvent être quantifiés par densitométrie.

Nous obtenons de bons résultats avec les Titan gels ; correspondant aux résultats obtenus par le fournisseur ; avec une bonne détection des différentes fractions : bêta, pré-bêta et alpha

Pour ces résultats, j'ai utilisé des échantillons congelés; mais pour obtenir de meilleurs résultats des échantillons de plasma frais doivent être utilisés.

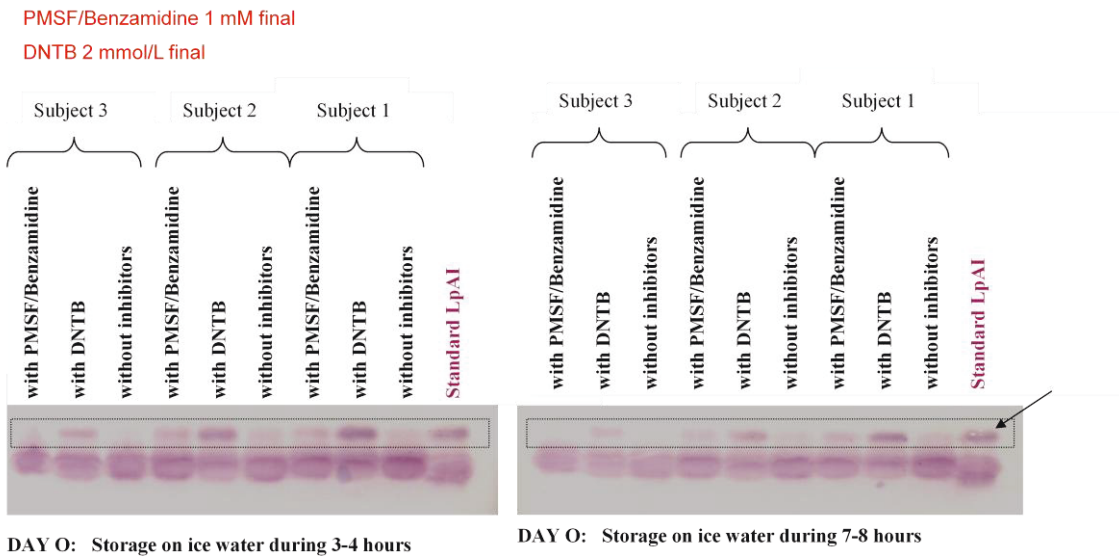
1.2 Détection des pré-β HDL dans le plasma



*Fractions 8 and 9 are prebeta AI and alpha AI

Figure 18 : Détection des pré-β HDL sur gel avec Titan Gel Lipoprotein et par immunoblot avec l'anticorps anti-apoAI humaine.

1.3 Effets de la durée de stockage et de la température sur la quantité relative des pré- β HDL



Anti Human apo AI 1:10 000 on PVDF membrane

Figure 19 : Résultats des immunoblots obtenus avec des échantillons de plasmas de 3 patients, avec ou sans inhibiteurs, stockés pendant 3-4 heures et jusqu'à 7 à 8 heures.

Dans les échantillons non prétraités, la concentration des pré- β HDL diminue considérablement juste après la collecte, passant en dessous de la ligne de base. La température de stockage affecte la quantité des pré- β HDL mesurées chez les sujets normolipidémiques. Les pré- β HDL sont plus stables sur glace qu'à température ambiante. A température ambiante (24 ° C), la concentration des pré-bêta HDL mesurée diminue en fonction du temps, alors que sur la glace, la concentration des pré- β HDL mesurée diminue lentement avec le temps. Lorsque les échantillons sont stockés sur glace, les valeurs des pré- β HDL apparaissent stables pendant 4 heures, ces valeurs diminuent sur des périodes de conservation plus longues.

1.4 Effets du DNTB sur la stabilité des pré- β HDL

Effet des inhibiteurs sur la stabilité des pré β HDL pendant le stockage sur glace

Le plasma a été obtenu à partir de 7 volontaires normolipidémiques. Le plasma a été stocké à 0°C (sur glace) avec ou sans inhibiteurs pendant 7 heures. Les échantillons ont été prélevés à différents intervalles de temps, et les concentrations des pré-bêta HDL ont été immédiatement déterminée à chaque point d'échantillonnage par dosage immunologique comme décrit dans Matériel et Méthodes.

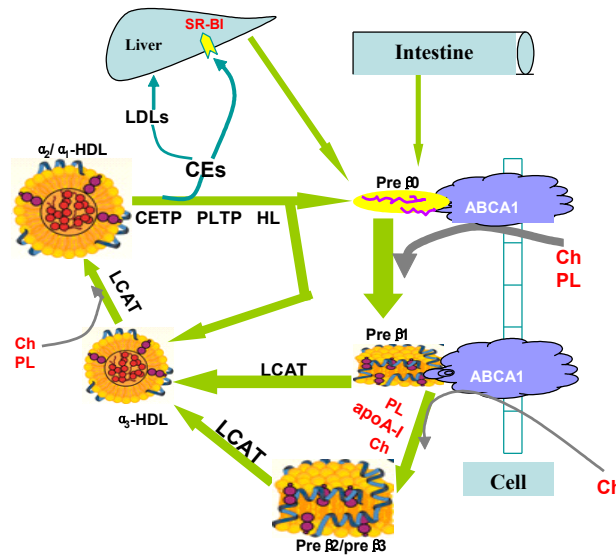
Il y a une baisse initiale de la quantité relative, avec chaque condition, pour les temps de stockage ≤ 1 h. La baisse initiale a été empêché par une incubation en présence de DTNB (à 2 mmol / L), un inhibiteur de la LCAT. Le DTNB inhibe les changements de concentration des pré- β HDL mesurées pendant le stockage dans des sujets normolipidémiques. Lorsque le couple d'inhibiteurs PMSF/benzamidine est ajouté au sang total, une diminution des quantités relatives des pré- β HDL a lieu, à peu près identique à celle observée dans les échantillons sans inhibiteurs. Comme décrit ci-dessus, les échantillons stockés sur glace avec DTNB montrent que la diminution lente de la quantité des pré- β HDL à t=7 h est presque 2 fois supérieur à celle sans inhibiteurs. Toutefois, la concentration des pré- β HDL avec DTNB à t=4 h est plus élevé que les résultats sans inhibiteurs et aussi plus élevé que les données avec PMSF/benzamidine, puis diminuée nettement après 4 heures.

2. Discussion

Ces résultats indiquent clairement que le DTNB donne les meilleurs résultats. Le traitement avec le DTNB est peu coûteux, c'est une méthode simple, et fiable. L'estimation relative des pré-β HDL dans les échantillons stockés nécessite une inhibition de l'interconversion des pré-β HDL et α-HDL au cours du stockage. La conversion des pré-β HDL en α-HDL est promue par la LCAT, alors que la réaction inverse est favorisée par plusieurs facteurs, notamment la CETP, PLTP, la lipase hépatique, et la sérum amyloïde A protéine. Ce phénomène peut être bloqué par l'inhibition de la LCAT ou par co-incubation avec certains types de cellules, telles que les fibroblastes et les macrophages. Le stockage du plasma sur glace réduit la vitesse à laquelle les pré-β HDL sont converti en α-HDL.

L'activité de la PLTP peut être également impliquée dans l'augmentation des pré-β HDL en présence du DNTB.

Fig. 1



NB: PL: phospholipids; Ch: cholesterol

Figure 20 : Schéma de l'inter-conversion des HDL du système RCT. La conversion des pré-β-HDL en α-HDL est promue par la LCAT, alors que la réaction inverse est favorisée par plusieurs facteurs, notamment la CETP, PLTP et HL. Le cycle RCT commence et se termine par la même particule, préβ0-HDL.

Les HDL ont d'importantes propriétés cardioprotectrices, et cela est dû en partie à leur rôle dans la voie du transport inverse du cholestérol (RCT). Les progrès récents dans la définition et la mesure des sous-populations d'HDL ont entraîné un nouvel aperçu sur les mécanismes par lesquels les HDL apportent des effets protecteurs par le RCT. Une petite proportion de plasma pre β -HDL, en particulier les plus petits pre β 0 et pre β 1-HDL, a été identifiée comme un très efficace accepteur initial de cholestérol cellulaire. Les pre β -HDL semblent jouer un rôle essentiel dans la voie initiale du RCT, assurant facilement l'élimination du cholestérol en excès des cellules périphériques, diminuant la formation de cellules spumeuses et des lésions athéroscléreuses associées. Bien que l'importance clinique des petits pre β -HDL a été largement décrite dans la littérature, les résultats obtenus à partir de la plupart des études restent hétérogènes. A cause en partie de la difficulté de l'évaluation quantitative des pre β -HDL et de sa nature dynamique dans la circulation. Toutefois, la précision de l'évaluation du risque de maladie coronarienne (CVD) en utilisant les biomarqueurs pourrait être améliorée par des méthodes de qualification des sous-populations d'HDL.

D- VERS UNE STANDARDISATION DE LA METHODE DE QUANTIFICATION DES MICROPARTICULES ADAPTEE EN RECHERCHE CLINIQUE

Le second projet avait donc pour but d'examiner la relation entre l'hypercholestérolémie familiale et les microparticules circulantes. Plusieurs études ont montré que les taux élevés de MPs circulantes étaient associés à divers pathologies et de nombreux travaux visent actuellement à déterminer les valeurs diagnostiques ou pronostiques potentielles de celles-ci. Les techniques de quantification des MPs à partir de prélèvements sanguins sont très variables entre laboratoires et sont vraisemblablement responsables des divergences observées sur les concentrations de MPs circulantes relatées dans la littérature.

Dans le contexte d'études cliniques, il est aujourd'hui indispensable de tenir compte des sources de variabilité et donc de mettre au point et d'utiliser une méthode de détection précise et standardisée. L'identification de MPs circulantes nécessite de nombreuses précautions préanalytiques tant au niveau du prélèvement qu'au niveau du traitement des échantillons. Nous avons d'abord étudié l'impact de la nature du tube utilisé pour le prélèvement, du délai de prise en charge avant centrifugation, et de la congélation du plasma sur quantification des MPs circulantes.

Dans un premier temps, nous avons mis en place au sein de notre laboratoire l'utilisation de billes de calibration Megamix (Biocytex) () permettant d'assurer la stabilité des réglages des paramètres de taille/structure du cytomètre mais aussi la reproductibilité intra et inter-instrument. Pour ce faire, nous avons testé leur utilisation sur le cytomètre disponible au laboratoire : Canto ATM (BD Biosciences).

Dans un second temps, nous avons appliqué cette méthode fiable et validée à la caractérisation et quantification des MPs totales, MPs plaquettaires et MPs endothéliales dans le plasma de patients. Notre choix s'est porté sur une cohorte de patients atteints d'hypercholestérolémie familial pour les raisons suivantes : **(1)** Certaines pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires à risque thrombotique accru, sont associées à des taux élevés de microparticules, ce qui confère à ces dernières un potentiel rôle pronostique. (). **(2)** Les niveaux élevés de microparticules endothéliales sont également associés à la plupart des facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'obésité, l'hypertension, le diabète, et semblent être prédictifs d'un pronostic clinique péjoratif ().

I- Résultats

1. Optimisation du prélèvement plasmatique pour la quantification des microparticules

1.1 Isolement et conservation du plasma des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale - Choix du type de tube de prélèvement

L'ensemble des articles publiés sur la quantification des MPs utilise un tube citraté. Parmi les tubes citratés disponibles, on distingue le tube citraté trisodique et le tube CTAD qui est généralement utilisé pour la surveillance des traitements par l'héparine et recommandé lors d'un délai d'acheminement long au laboratoire. Nous avons comparé la quantité de MPs AnnexinV⁺ et de MPs AnnexinV⁺ CD31⁺ CD41⁻ pour un même patient prélevé avec ces 2 types de tube (expérience réalisée pour 3 patients). Nous n'avons pas observé de différence significative entre 2 tubes (8% en moyenne de variation).

1.2 Comparaison entre prélèvements frais et congelés

La majorité des publications sur la quantification des MPs utilisent des échantillons congelés à -80°C.

Cependant, l'hétérogénéité des résultats publiés nous a conduits à comparer la quantification des MPs à partir de prélèvements plasmatiques frais puis congelés (n=3). Le plasma recueilli, conservé à -80°C, est décongelé selon une procédure standard (30 min à température ambiante). Sur la moyenne des 3 échantillons réalisés, nous n'observons pas de différence significative sur la quantification des MPs issues de prélèvements plasmatiques frais *versus* congelés.

Pour ce projet, nous avons, malgré ces résultats, préféré utiliser pour des prélèvements plasmatiques frais.

1.3 Effet du délai entre prélèvement et sa congélation sur le dosage des microparticules

L'effet du temps entre le moment du prélèvement sanguin et la prise en charge du prélèvement (centrifugation, congélation) a été évalué en réalisant une quantification des MPs sur le prélèvement congelé à 4h *versus* à 18h après la prise de sang (n=2). Nous avons observé que la quantité des MPs AnnexinV⁺ est stable à ces 2 temps (323/μL à 4h, et 373/μL à 18h).

Toutefois, le bruit de fond était plus important à 18h, ce qui rendait l'analyse plus difficile (nombre important d'événements dans la zone taille/structure).

Dans la suite du travail, les prélèvements ont donc été traités dans les 2 heures qui suivent la ponction veineuse.

2. Optimisation et standardisation de la fenêtre de détection des microparticules avec les billes Mégamix

En raison de leur faible taille (0.1-1 μ m), la détection des MPs nécessite des conditions de travail proches de la limite de détection des cytomètres. La standardisation des comptages de MPs requiert la maîtrise de cette limite, variable selon les cytomètres de 0.5 à 1 μ m, pour un compromis optimal entre prise en compte des MPs et exclusion du bruit de fond. Les billes Mégamix (Biocytex) permettent de définir de façon standardisée la zone d'analyse des MPs entre 0.5 et 1 μ m et d'assurer la stabilité des réglages d'un jour à l'autre. Nous avons donc procédé à l'acquisition des billes Mégamix à l'aide du cytomètre Canto A BD Biosciences. Tout d'abord, on visualise sur un histogramme en FL1 (fluorescence dans le canal 1) *versus* SSC, 3 régions correspondant aux billes de 0.5 μ m, 0.9 μ m et de 3 μ m (Figure 21 a). Les réglages des photomultiplicateurs (FL1, 2 et 3) sont effectués pour que les billes se situent dans une décade définie. La dernière étape consiste en un réglage du photomultiplicateur FSC. Un discriminant (seuil d'exclusion des événements) est appliqué sur la FSC à 1, et le réglage du canal FSC s'effectue de façon à visualiser 50 % de billes de 0.5 μ m et 50 % de billes de 0.9 μ m (Figure 21 b). Le pourcentage initial de mélange de billes 0.5/0.9 μ m était de 66 % et 33 %. Cette procédure permet de placer le seuil de détection des événements sur la taille (FSC) toujours de la même façon (exclusion de billes 0.5 μ m pour arriver à un rapport 1/1 entre les billes 0.5 et 0.9 μ m). La zone d'analyse des MPs est définie sur sa partie inférieure par le seuil appliqué en FSC comme définie précédemment (Figure 21 c). La partie supérieure est définie par la fin du nuage des billes de 0.9 μ m.

La distinction entre les billes 0.5 et 0.9 μ m en FSC est excellente (Figure 21 b). Le réglage de la fenêtre (taille/structure) des MPs est donc optimal et stable dans le temps.

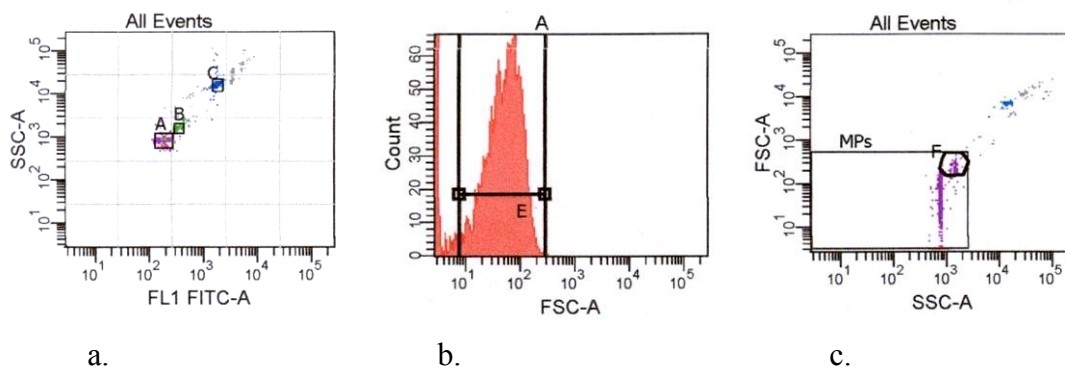


Figure 21 : Utilisation des billes Mégamix pour calibrer la zone de taille dans laquelle les microparticules sont quantifiées.

- Visualisation des billes 0.5 (A), 0.9 (B) et 3 μm (C) sur le paramètre de fluorescence FLI/SSC ;
- Réglage du PMT de la FSC de façon à obtenir 2 populations égales de 50% de billes 0.5 μm et 0.9 μm (49 % de billes 0.5 μm (E) et 50.9 % de billes 0.9 μm (F) ;
- Positionnement de la fenêtre FSC/SSC des MPs. Grâce à cette procédure, la limite de taille supérieure et inférieure(discriminant positionné comme indiqué précédemment) des éléments quantifiés est standardisée ; d. Absence de résolution suffisante en FSC : absence de distinction des 2 billes 0.5 et 0.9 μm .

3. Mise au point du multimarquage et de la quantification en valeur absolue des microparticules

Après avoir défini les réglages optimaux qui nous permettent d’avoir une zone de taille (FSC/SSC) standardisée pour chaque tube analysé (figure 22), nous avons mis au point les multimarquages avec différents anticorps couplés à différents fluorochromes afin de déterminer les expressions antigéniques à la surface des MPs. Le nombre total de MPs est quantifié par cytométrie en flux après un marquage de la Pser présente à la surface des MPs par l’annexinV. L’échantillon de 30 μL de plasma est incubé avec 5 μL d’AnnexinV FITC (Annexin V apoptosis detection kit I, BD Biosciences). Après 30 min d’incubation, la réaction est stoppée à l’aide de 500 μL de « binding buffer ». Les combinaisons d’anticorps retenues pour l’analyse des plasmas ont été déterminées en fonction du spectre d’émission de chaque fluorochrome et du cytomètre utilisé. Les anticorps sont centrifugés à 2000g pendant 2 min, afin d’éliminer les agrégats d’anticorps qui pourraient perturber l’analyse sur le cytomètre (événements fluorescents dans la zone de taille des MPs). Ils sont ensuite incubés à température ambiante pendant 15-30 min avec 30 μL de plasma à tester et 30 μL de billes

flowcount pour la quantification en valeur absolue. A la fin de l'incubation, le plasma n'est pas lavé afin de ne pas perdre les MPs, mais passé directement en phase d'acquisition sur le cytomètre. L'étude étant centrée sur la recherche des MPE dans l'hypercholestérolémie familiale, nous avons évalué de 3 façons différentes les MPs endothéliales : MPs de phénotype $CD31^+ CD41^-$ (tube 1 : AV-FITC/CD31-PE/CD41-ECD), MPs de phénotype $CD146^+$ (tube 2 : AV-FITC/CD146-PE) et MPs de phénotype $CD62E^+$ (tube 3 : AV-FITC/CD62E⁺ PE). Un contrôle isotypique (tube 4 : AV-FITC, IgG1-PE, IgG1-ECD) est réalisé pour chaque patient. Le phénotype des MPs endothéliales peut être soit $CD31^+ CD41^- AV^{+/-}$ (tube1) ; $CD146^+ AV^{+/-}$ (tube 2) ; $CD62E^+ AV^{+/-}$ (tube 3).

Pour réaliser le comptage en valeur absolue des MPs présentes dans le plasma, nous avons utilisé des billes flow Count (Figure 22). Le nombre d'évènements quantifiés dans la zone correspondant aux billes et rapporté au nombre de billes ajoutées à l'échantillon permet d'obtenir un quotient X, qui au final permet de déterminer le nombre absolu de MPs présentes dans l'échantillon.

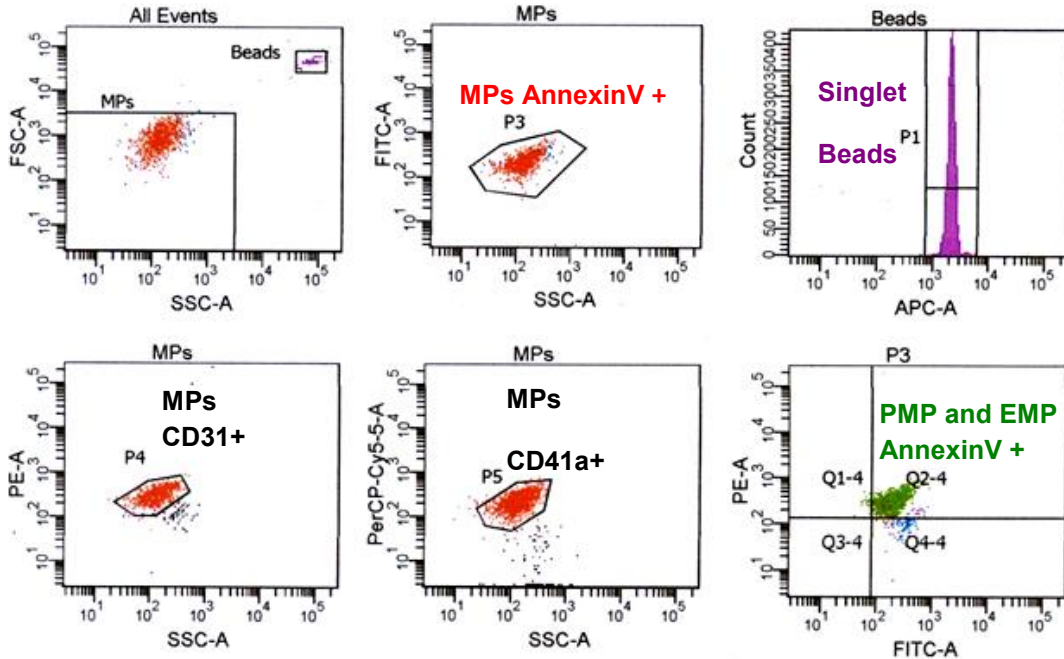
L'étude a été réalisée à l'aide d'un cytomètre Canto ATM (BD Biosciences). Le logiciel utilisé pour l'acquisition et l'analyse est le logiciel DIVA 6.1 software (BD Biosciences).

Figure 22 : Protocole de quantification et d'identification des MPs.

A. Zone taille-structure standardisée à l'aide de billes Megamix (Biocytex), MPs Annexine V positive (AV^+) en rouge ; B. Histogramme représentant les populations : Annexine V positive (AV^+ 45.7%) et Annexine V négative (AV^- 54.3 %) ; C. Fenêtrage des billes Flow count qui permettent de compter les MPs en valeur absolue. D. E. Représentation des populations de MPs Annexine V positive (AV^+) et Annexine V négative (AV^-) identifiées dans les 3 tubes à l'aide des marquages CD41 ECD, CD31 PE, CD62E PE, CD146 PE.

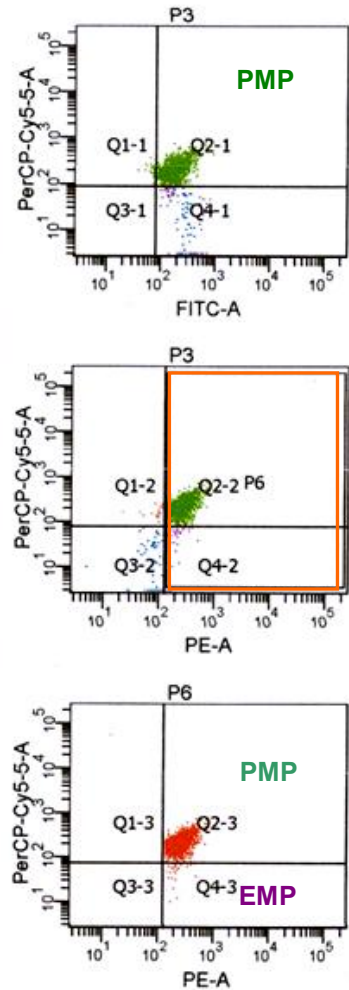
PE : phycoerythrin ; ECD pour phycoerythrin-texas red x.

FACSDiva Version 6.1.1



Experiment Name: Microparticles master_final_140111
 Specimen Name: TUBES MPs
 Tube Name: POS
 Record Date: Jan 14, 2011 10:23:02 AM
 \$OP: COAG
 GUID: fbe618bb-fa67-4d28-8406-a2094b92e4e1

Population	#Events	%Parent	%Grand Par...	%Total
All Events	5,000	###	###	100.0
MPs	1,710	34.2	###	34.2
P3 <i>MPs AnnV+</i>	1,699	99.4	34.0	34.0
Q1-4	22	1.3	1.3	0.4
Q2-4 <i>MPs plt+endo</i>	1,569	92.3	91.8	31.4
Q3-4	1	0.1	0.1	0.0
Q4-4	107	6.3	6.3	2.1
Q1-1	24	1.4	1.4	0.5
Q2-1 <i>MPs plt</i>	1,538	90.5	89.9	30.8
Q3-1	1	0.1	0.1	0.0
Q4-1	136	8.0	8.0	2.7
Q1-2	19	1.1	1.1	0.4
Q2-2	1,559	91.8	91.2	31.2
Q3-2	72	4.2	4.2	1.4
Q4-2	49	2.9	2.9	1.0
Q1-3	21	1.2	1.2	0.4
Q2-3 <i>MPs plt</i>	1,565	92.1	91.5	31.3
Q3-3	75	4.4	4.4	1.5
Q4-3 <i>MPs endo</i>	38	2.2	2.2	0.8
P4 <i>MPs CD31+</i>	1,579	92.3	31.6	31.6
P5 <i>MPs CD41a+</i>	1,586	92.7	31.7	31.7
P6 <i>MPs plt+endo</i>	1,591	93.0	31.8	31.8
Beads	3,257	65.1	###	65.1
P1	3,256	100.0	65.1	65.1



4. Méthode retenue

Nous retiendrons pour l'analyse de la cohorte de patients les conditions suivantes : **1)** Prélèvements sur tube CTAD et prise de charge optimale dans les 2h et analyse sur échantillons frais, **2)** Utilisation du cytomètre Canto ATM, avec calibrage avant chaque série d'analyse selon le protocole Mégamix, et **3)** Réaliser 4 tubes pour chaque échantillon qui seront analysés selon le protocole déterminé précédemment (Figure 22).

II- Commentaires et perspectives

Cette standardisation m'a permis de quantifier les MPs circulantes chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale.

Ainsi ce travail a permis de valider au laboratoire une méthode fiable pour la caractérisation et la quantification des MPs totales, MPs plaquettaires et des MPs endothéliales dans le sang circulant.

Notre objectif était de quantifier les MPs circulantes pour des applications en recherche clinique ; en particulier pour la mesure des microparticules circulantes chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale en traitement LDL-aphérèse.

Les rôles biologiques des MPs sont variables et leur implication dans des pathologies telles que la thrombose, les pathologies coronariennes, ouvre des domaines très vastes dans lesquels une quantification des MPs pourra devenir un nouvel outil de diagnostic ou de suivi.

L'identification d'applications cliniques à la quantification des MPs circulantes nécessite au préalable de mieux définir tous les paramètres préanalytiques et analytiques permettant d'aboutir à une évaluation fiable des MPs. Globalement, deux grandes techniques sont utilisées dans la littérature (). La cytométrie en flux permet d'évaluer la taille, l'expression ou non d'AV, et l'expression des A_gs permettant l'identification des différentes sous-populations de MPs. Par contre même si ces éléments sont correctement identifiés, il n'y a pas dans cette technique la possibilité de vérifier leur fonctionnalité. Les techniques ELISA sélectionnent les MPs AV⁺ ou les MPs de par leur expression de protéines spécifiques () et évaluent leur propriété procoagulante par la production de thrombine. Cette technique apporte une évaluation qualitative des MPE.

L'évolution des connaissances sur le « phénotype » des MPs apporteront de nouvelles cibles pour développer des tests permettant de caractériser au mieux les différentes sous-populations de MPs.

Ce travail a permis de valider une méthode fiable pour la caractérisation et la quantification des MPs, des MPP et des MPE dans le sang circulant par cytométrie de flux. De nombreux paramètres inhérents à chaque cytomètre (sensibilité de détection, angle de diffusion de la lumière) peuvent être responsables des différences observées au niveau de la quantification des MPs dans la littérature. Les industriels sont conscients de cette demande et par exemple les deux nouveaux cytomètres de la gamme Beckmann Coulter (Galios[®] et Navios[®]) apportent une meilleure résolution sur les éléments de petite taille. La meilleure détection de la lumière diffusée dans le canal FSC à grand angle (8-19°) permet d'évaluer de façon plus résolutive la population de MPs de taille allant de 0,3 à 1 µm non évaluées jusqu'alors. Face aux difficultés techniques de cette quantification, l'utilisation de cytomètres dédiés à l'analyse des MPs permettrait de s'affranchir de la contamination éventuelle de débris cellulaires (bruit de fond important) et de travailler dans des conditions optimales d'utilisation et de réglages de l'appareil. La prise en compte des variables préanalytiques et analytiques ainsi que la fiabilité de la technique utilisée pour déterminer l'origine de MPs ne pourront qu'enrichir nos connaissances sur le profil phénotypique, les conditions de libération, les fonctions et la clearance des MPs. La quantification des MPs a un avenir prometteur comme outil diagnostique et/ou pronostique dans des situations pathologiques variées, mais seulement si l'ensemble de ces paramètres sont pris en compte au préalable.

E- MESURE DES MICROPARTICULES CIRCULANTES PAR CYTOMETRIE EN FLUX CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS D'HYPERCHOLESTEROLEMIE FAMILIALE EN TRAITEMENT LDL-APHERESE (Projet n°2)

I- Rationnel et objectif de l'étude des microparticules endothéliales : biomarqueurs de l'athérosclérose au début de l'hypercholestérolémie familiale

Ce projet fournira des données préliminaires pour une demande de bourse pour une étude plus détaillée afin d'évaluer le rôle des microparticules (MPs) circulantes comme un biomarqueur de la maladie cardiovasculaire au début de l'hypercholestérolémie familiale et des troubles cardiométaboliques liés.

- Hypothèse : Les microparticules circulantes reflètent l'athérosclérose précoce dans l'hypercholestérolémie familiale et répondent aux thérapies pour diminuer le cholestérol.

- But : Pour tester l'hypothèse de la mesure des microparticules endothéliales circulantes chez les patients avec une hypercholestérolémie familiale (HF) et chez des sujets normocholestérolémiques sans HF, et d'évaluer la réponse des MPs au traitement par les statines et par la LDL-aphérèse chez les patients HF.

L'objectif de notre travail a donc été de chercher s'il existait une relation entre la quantité de MPs circulantes, en particulier de MPs endothéliales, et les facteurs de risque cardiovasculaires usuels et/ou l'hypercholestérolémie familiale. Notre travail s'est déroulé au sein d'un service clinique et d'une unité de recherche spécialisés dans la détection des anomalies précoces de la paroi artérielle et dans la prévention cardiovasculaire. Nous avons pu y étudier les caractéristiques des 6 premiers patients inclus dans l'étude « Circulating microparticles as a biomarker of early atherosclerosis in familial hypercholesterolaemia », cohorte prospective devant inclure 36 patients, chez lesquels seront analysées la valeur prédictive et la signification des MPs vis-à-vis des marqueurs cliniques, structuraux et fonctionnels du risque athéromateux.

- Contexte : L'hypercholestérolémie familiale est le plus commun et grave désordre monogénique du métabolisme du cholestérol entraînant une élévation du cholestérol plasmatique et une maladie coronarienne prématurée. L'état est due aux mutations qui affectent la production et la fonction du LDL récepteur. Le risque coronarien dans l'HF

pourrait être inversé avec des interventions précoces par des mesures de style de vie et une thérapie pour abaisser le cholestérol, en particulier avec les statines. L'expression phénotypique de l'hypercholestérolémie familiale, incluant le risque de maladie coronarienne, est variable. Il y a une condition clinique pour la détection précoce des individus avec une HF qui sont à haut risque de développer une maladie cardiovasculaire. Tout cela peut être réalisé par des mesures directs de la morphologie et la fonction de la paroi artérielle, les techniques nécessitent un équipement coûteux et un haut niveau d'expertise technique. La mesure d'un biomarqueur circulant adapté peut se permettre par un simple test pour détecter l'athérosclérose précoce dans l'HF, ainsi que l'efficacité des thérapies, telles que les statines et la LDL-aphérèse ().

Il y a un intérêt croissant dans la mesure des microparticules circulantes comme biomarqueurs des maladies cardiovasculaires. Les MPs circulantes sont dérivées de cellules endothéliales, leucocytaires et plaquettaires. Les microparticules endothéliales peuvent refléter d'une mort cellulaire et potentiellement fournir un indicateur précoce de la dysfonction des cellules endothéliales. A petite échelle, les données d'observation suggèrent que les microparticules endothéliales sont corrélées avec les facteurs de risque cardiovasculaire. La cytométrie en flux est la méthode standard pour l'évaluation des microparticules circulantes, mais cette technique est seulement adaptée pour détecter des changements sur des particules de taille supérieure à 300nm. De nouvelles méthodes, (par exemple l'analyse de nanoparticule de suivi) permettent une évaluation plus sensible des microparticules circulantes de toutes tailles en dessous de 50nm. De récentes avancées dans cette technologie avec l'ajout de fluorescence dans le système facilite aussi la mesure simultanée de la taille, du phénotype et de la concentration (Dragovic et al).

II- MATERIEL ET METHODE

1. Patients et protocole de l'étude

Une étude de cas contrôle et deux études d'intervention ouverte seront réalisés. Les microparticules circulantes seront mesurées chez 15 patients diagnostiqués avec une hypercholestérolémie familiale (HF) sans thérapie médicamenteuse, 6 patients HF subissant la LDL-aphérèse et chez 15 contrôles normocholestérolémiques avec âge, sexe et poids appariés. Le diagnostic de l'HF sera fait génétiquement. *Excusions* : diabète, anémies, et autres désordres hématologiques , hypertension, maladie rénale chronique, fumeurs, maladies

cardiovasculaires installées, médicaments connus pour affecter les fonctions endothéliales et plaquettaires. Les 15 patients FH seront interviewés avant et après les 4 mois de thérapie statine, avec et sans ezetimibe, suffisamment pour observer une réduction d'au moins 40% du cholestérol LDL. Les 6 patients en traitement LDL-aphérèse seront aussi étudiés immédiatement avant et après le protocole.

Les microparticules (totales, plaquettaires, endothéliales et le facteur tissulaire) contenus dans les plasmas appauvris en plaquettes (PPP) seront évaluées par un nombre de méthodes incluant la cytométrie en flux, ELISA, les analyses de la capacité de génération de thrombine et de nanoparticules de suivi ; en utilisant une nouvelle technique: *Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)* pour la caractérisation de la distribution en taille.

Ces analyses seront poursuivies dans le laboratoire de Dr Paul Harrison, Centre d'hémophilie et de thrombose d'Oxford, Hôpital Churchill, Université d'Oxford, Royaume-Uni.

2. Prélèvement et traitement des échantillons

Le prélèvement sanguin doit être effectué dans des conditions standard.

- 15mL de sang veineux seront collectés dans la position semi-couchée avec un minimum de stase veineuse utilisant une aiguille de calibre 21 et un système Vacutainer. Les étapes suivantes seront poursuivies (Figure 23):

Etape 1 – Les premiers 3mL seront collectés dans un tube EDTA et utilisés pour mesurer la numération formule sanguine, incluant les plaquettes. Ce prélèvement ne sera pas utilisé pour l'analyse des microparticules, puisque les cellules seront immédiatement activées après le prélèvement sanguin.

Etape 2 – Les 12mL suivants seront collectés dans un tube citrate pour la préparation du plasma appauvri en plaquettes. On utilise un tube citrate (0.129 M de citrate de sodium) plutôt qu'un tube classique contenant de l'EDTA ; celui-ci pourrait entraîner une altération de l'expression de certains marqueurs.

Etape 3 – Les échantillons de sang citrate sont centrifugés à 1500g pendant 15min à température ambiante dans les 30 minutes après prélèvement, afin d'aboutir au plasma.

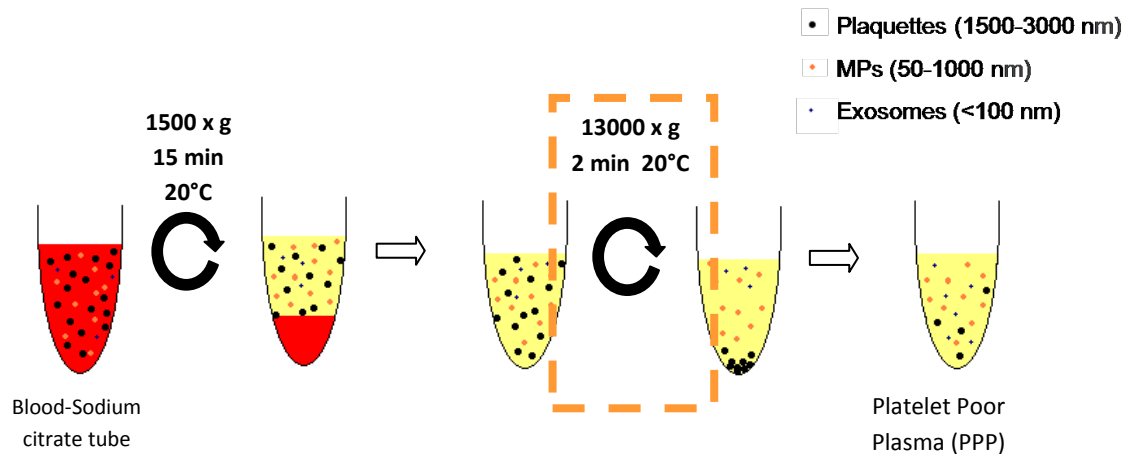


Figure 23 : Schéma du protocole de préparation du plasma pauvre en plaquettes (PPP).

Etape 4 – Le surnageant (2/3 supérieur) correspondant au plasma sera prélevé doucement à l'aide d'une pipette Pasteur en polypropylène et transféré dans un second tube citrate.

Etape 5 – Le plasma dans le second tube citrate sera centrifugé à 13.000g pendant 2min à température ambiante afin d'éliminer les plaquettes résiduelles et les débris cellulaires. Cette deuxième centrifugation permet d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes (PPP) permettant des mesures cohérentes et non surévaluées des quantités de MPs.

Etape 6 – Le surnageant sera délicatement prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur en polypropylène et ensuite analysé ou aliquoté dans des tubes Eppendorf (aliquots de 65µL, et 300µL) et congelé immédiatement dans l'azote puis à -80°C jusqu'à analyse.

3. Méthodes d'analyse

Toutes les analyses de microparticules seront réalisées jusqu'à un maximum de 12 mois après prélèvement de l'échantillon.

On distingue au moins 3 types d'analyses : les techniques par chromatographie sur couche mince de haute affinité, celles fondées sur la cytométrie en flux et les méthodes ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay ou dosage immuno-enzymatique sur support solide).

Les deux dernières techniques sont, de loin, les plus employées et se fondent sur l'utilisation d'anticorps hautement spécifiques des antigènes présents à la surface des MPs. Ceux-ci permettent de distinguer les différentes populations de MPs présentes au sein des échantillons et de déterminer leur origine cellulaire.

La méthodologie généralement suivie implique de pouvoir quantifier séparément la totalité et les différents types de MPs au sein d'un même prélèvement. Chaque échantillon est fractionné afin d'effectuer ces diverses analyses. On ajoute à l'une de ces fractions de l'annexine V, protéine se liant spécifiquement, en présence d'ions calcium, aux phospholipides anioniques comme la phosphatidylsérine (PS). La majorité des membranes des MPs étant composée de PS, l'annexin V va se fixer sur la quasi-totalité des MPs et ainsi permettre leur quantification globale. Les autres fractions issues de l'échantillon originel vont être analysées après ajout d'anticorps spécifiques des antigènes de surface des MPs, sachant que celles de même origine peuvent être caractérisées par différents anticorps. Par exemple, pour identifier les MPs dérivant des plaquettes, on utilise des anticorps anti GPIIb, anti CD31, anti GPIIb-IIIa,...(). Ce principe de phénotypage immunologique est commun aux deux principales techniques de dosage des MPs ; la cytométrie de flux et les méthodes ELISA.

3.1 Analyse par cytométrie de flux

La cytométrie de flux permet de quantifier et qualifier au sein d'un échantillon certaines particules, telles que des cellules ou des MPs. Le principe de fonctionnement repose sur le guidage et la focalisation des particules en suspension dans un flux laminaire de liquide, assurant leur passage une à une au travers d'un faisceau lumineux (généralement un faisceau LASER de longueur d'onde donnée). L'analyse de la lumière diffractée permet de déterminer la taille et la forme de chaque particule. Il est également possible de quantifier une population de particules bien précise en la marquant avec un fluorochrome spécifique (Figure 24). Dans le cas de l'étude des MPs, on doit ajouter un anticorps fluorescent se liant sur le complexe immun formé par l'antigène membranaire et l'anticorps spécifique.

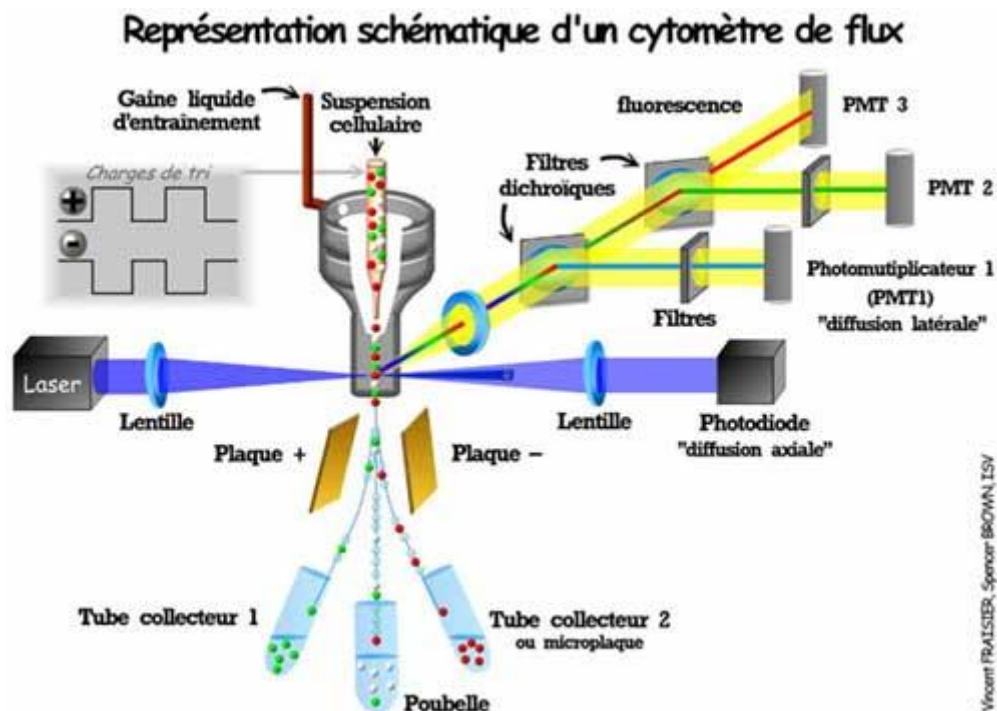


Figure 24 : Cytométrie de flux

Les anticorps anti protéine A sont couplés à un fluorochrome dont l'émission fluorescente est détectée par le capteur. Adapté de Brown S., Fraasier V., ISV CNRS.

Préalablement à l'analyse des échantillons, une calibration du cytomètre de flux est nécessaire et s'effectue par analyse de particules d'un diamètre spécifique et/ou émettant une lumière bien définie. Dans le cas de l'identification des MPs, on analyse, le plus souvent, des particules de 0.2 à 1 μm de diamètre et on recherche l'émission spécifique du ligand fluorescent.

L'avantage majeur de ce type d'analyse est de renseigner sur la taille, la densité des particules ainsi que sur l'intensité de la fluorescence (proportionnelle au nombre de récepteurs présent sur une MPs). Elle autorise également l'identification des MPs pauvres en PS. En revanche, elle manque de sensibilité pour détecter des MPs de moins de 0.4 μm dont la quantité ne peut toutefois être négligée. Par ailleurs, ce procédé s'avère relativement onéreux surtout pour des études de grande ampleur et ne permet l'analyse que d'un seul échantillon par manipulation. Enfin, la cytométrie de flux n'est pas un test fonctionnel : elle n'apporte aucun renseignement sur le potentiel pro-coagulant des MPs détectées.

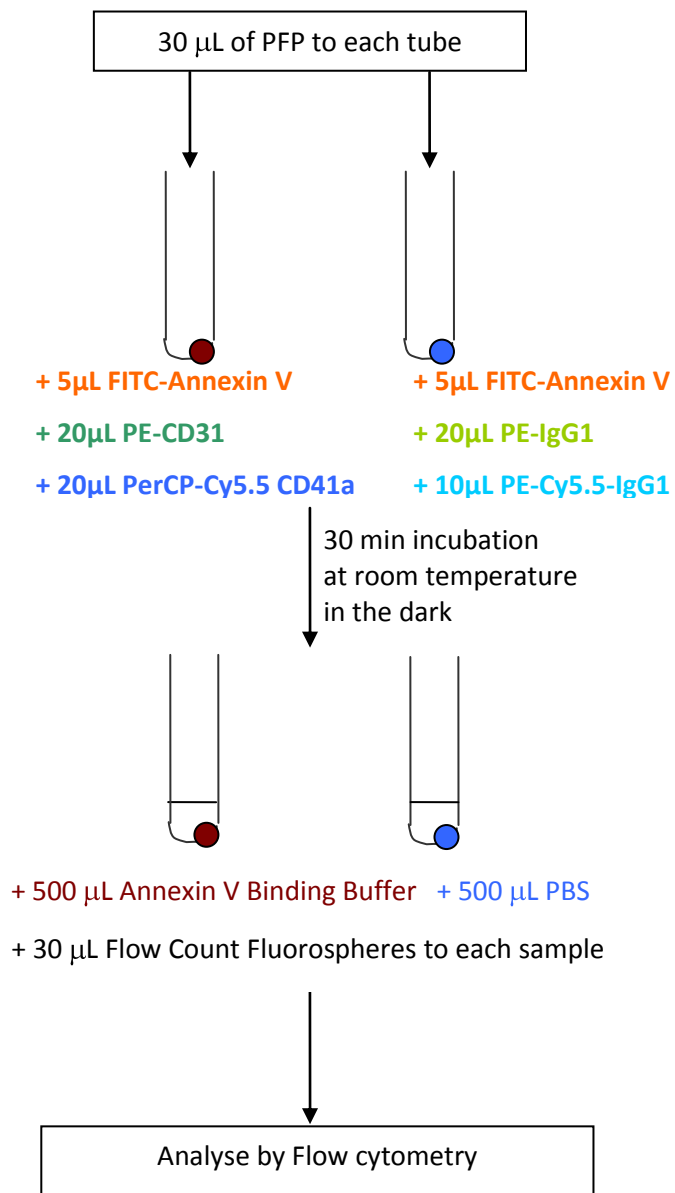


Figure 25 : Protocole de marquage pour la détection des microparticules endothéliales :

3.2 • Analyse statistique

Les données seront analysées par t-tests appariés, avec une différence de signification de 5%. Pour cette étude pilote la taille des échantillons ont été définis arbitrairement tel que 10 par groupe.

Les centres d'investigation : Centre de la thrombose et de l'hémophilie d'Oxford, Hôpital Churchill, Université d'Oxford, Clinique des désordres lipidiques, Hôpital Royal Perth, Université Western Australia.

III- Résultats et discussion

Après avoir décrit les caractéristiques de notre population de sujets, nous présenterons les résultats importants de notre travail en insistant sur les valeurs obtenues des MPs endothéliales.

1. Caractéristiques cliniques et biologiques de notre population

	PARTICIPANT	GENDER	AGE	DOCTOR	UMRN	Microparticles PIS	next LDC visit	Consent	Next Apheresis
1	Mandy Myers	F	43	GFW	H6001299	discussed & posted 3/2/11	16/02/2011	Consented on 16 th Feb	Sample taken on 2 nd March
2	Joan Davies	F	74	GFW	L0515822	discussed & posted 9/2/11	02/03/2011	Consented on 2 nd March	Sample taken on 19 th May
3	Simone Poor	F	42	JB	G0442030	discussed & posted 15/2/11	23/02/2011	Consented on 23 rd Feb	Sample taken on 4 th March
4	Brandy Graham	F	16	JB	G3258558	discussed & posted	20/09/2011	Consented on 20 th Sept	Sample taken on 20 th Sept
NEW PRE-STATIN FH									
	PARTICIPANT			DOCTOR	UMRN	Microparticles PIS	LDC visit for sam	Consent	4 month f/up app
1	Edna Moss	F	52	GFW	H3167435	discussed & posted	4th March 11.00	Consented on 23 rd Feb	TBC approx 4 th July 2011
NORMOCHOLESTEROLEAMIC									
	PARTICIPANT			DOCTOR	UMRN	Microparticles PIS	next LDC visit	Consent	XXXX
1	Kendall Pickering	F	32	TR	D7163148	discussed & posted 2/2/11	06/04/2011 15:15	Consented on 6 th April	Sample taken on 6 th April

2. Résultats

2.1. Résultats sur les patients HF avant et après LDL-aphérèse:

APHERESIS												
PARTICIPANT	UMRN	LPMIR No.	DOB	DATE	N°	STATUS	TOTAL MPs (x 10 ⁹ /L)	PMPs (x 10 ⁹ /L)	EMPs (x 10 ⁹ /L)	PDM (x 10 ⁹ /L)	PMC (%)	AP (%)
							Total MPs	Platelet MPs	Endothelial MPs	Platelet derived microparticles	Platelet monocytes complexes	Activated Platelets
							IN Platelet Free Plasma			IN Whole Blood		
1	Mandy Myers	H6001299	HMIC10001A	21/04/1968	02/03/2011	pre	134	76	42	60	27,1%	5,9%
						post	160	19	14	102	55,7%	21,7%
					5/23/2011 post freezing	pre	209	150	43			
						post	156	54	18			
09/09/2011	pre	58	12	12	42	37,2%	1,6%					
	post	91	21	32	32	47,2%	2,7%					
2	Joan Davies	L0515822	HMIC10002Y	09/08/1937	19/05/2011	pre	30	4,04	3,85	281	22,2%	38,0%
						post	275	5,19	73	526	34,7%	15,2%
					5/23/2011 post freezing	pre	40	22	3,08			
						post	303	9,04	38			
08/09/2011	pre	12	4,23	3,46	45	28,5%	0,4%					
	post	10	1,35	2,69	50	33,4%	0,5%					
3	Simone Poor	G0442030	HMIC10003W	11/10/1969	04/03/2011	pre	28	13	2,12	80	25,0%	5,5%
						post	51	1,92	0,1924	43	42,7%	1,6%
					5/23/2011 post freezing	pre	63	44	8,66			
						post	75	38	6,16			
09/09/2011	pre	33	8,46	17	34	22,3%	17,9%					
	post	10	0,38	3,27	36	24,9%	0,8%					
4	Brandy Graham	G3258558	HMIC10004U	05/10/1995	20/09/2011	pre	FITC (250) 8,85	2,12	3,66	40	35,7%	0,26%
						post	FITC (250) 12	1,54	4,81	38	17,7%	0,22%
					9/22/2011 post freezing	pre	FITC (250) 24	15	2,89			
						post	FITC (250) 28	25	1,35			
					9/22/2011 post freezing	pre	FITC (275) 69	59	5,96			
						post	FITC (275) 37	30	2,69			

2.2. Résultats sur patients HF avant traitement Statine :

NEW PRE-STATIN FH													
PARTICIPANT	UMRN	LPMIR No	DOB	DATE	STATUS	TOTAL MPs (x 10 ⁹ /L)	PMPs (x 10 ⁹ /L)	EMPs (x 10 ⁹ /L)	PDM (x 10 ⁹ /L)	PMC (%)	AP (%)		
						Total MPs	Platelet MPs	Endothelial MPs	Platelet derived microparticles	Platelet monocytes complexes	Activated Platelets		
						IN Platelet Free Plasma			IN Whole Blood				
1	Edna Moss	H3167435	HMIC10005S	29/06/1959	04/03/2011	1	pre	208	95	0,5772	90	23,9%	7,6%
					27/07/2011	2	pre	44	36	2,69	40	10,6%	0,08%
					5/23/2011 post freezing	1	pre	210	186	7,696			

2.3. Résultats sur patients contrôles :

NORMOCHOLESTEROLEAMIC													
PARTICIPANT	UMRN	LPMIR No	DOB	DATE	STATUS	TOTAL MPs (x 10 ⁹ /L)	PMPs (x 10 ⁹ /L)	EMPs (x 10 ⁹ /L)	PDM (x 10 ⁹ /L)	PMC (%)	AP (%)		
						Total MPs	Platelet MPs	Endothelial MPs	Platelet derived microparticles	Platelet monocytes complexes	Activated Platelets		
						IN Platelet Free Plasma			IN Whole Blood				
1	Kendall Pickering	D7163148	HMIC10020W	01/12/1979	06/04/2011	1		199	187	4,81	272	40,6%	6,1%
					5/23/2011 post freezing	1		437	421	4,23			

2.4. Résultats du pool des échantillons contrôles PPP :

QUALITY CONTROL: Frozen (-80°C) Pool "Control" Platelet Free Plasma (PFP)

DATE	Voltage FITC	TOTAL MPs (x 10 ⁹ /L)	PMPs (x 10 ⁹ /L)	EMPs (x 10 ⁹ /L)
		Total MPs	Platelet MPs	Endothelial MPs
		IN Platelet Free Plasma		
14/01/2011	275	99	92	1,924
24/02/2011	275	101	95	1,66
02/03/2011	275	123	110	3,27
	275	108	96	2,12
04/03/2011	275	124	83	1,35
06/04/2011	275	102	88	0,1924
12/05/2011	275	95	81	4,23
19/05/2011	250	88	80	2,12
	250	89	80	5,19
23/05/2011	255	75	70	1,15
	255	102	92	1,53
27/07/2011	255	84	76	3,85
08/09/2011	250	56	52	1,924
20/09/2011	250	43	41	0,1924
AVERAGE		92	81	2,19
STDEV		23	18	1,46

3. Discussion

3.1. Interprétation des résultats

3.1.1 Microparticules et pression artérielle

Les valeurs de microparticules endothéliales et plaquettaires de Mandy Myers sont plus élevées que chez les deux autres patients HF, et elle a une pression artérielle élevée et des antécédents de maladie coronarienne. Je me demande si la pression artérielle pourrait affecter les microparticules endothéliales et plaquettaires. ('Effects of Severe Hypertension on Endothelial and Platelet Microparticles', Richard A. Preston, *Hypertension*. 2003)

3.1.2 Microparticules et LDL-aphérèse

- Est-ce que les microparticules libérées par la technique LDL-aphérèse pourrait affecter le nombre total de MPs obtenues en cytométrie en flux ?

Deux études récentes ont décrit la libération de microparticules pendant la LDL-aphérèse avec différentes méthodes (en excluant la double filtration) ().

Ces études ne concernent que les particules $>2\mu\text{m}$ alors que nous nous intéressons aux particules de $0,1$ à $1\mu\text{m}$. Vraisemblablement, des particules plus petites seraient également libérées de la colonne de filtration sur membrane. Le nombre de petites particules serait supérieur à celui des particules plus grosses (Fig 1, Martins). Martins a trouvé environ 500.000 particules $>2\mu\text{m}$ qui seraient libérés chez un patient lors d'une session avec le système Liposorber, ce qui correspond dans 5L de sang à seulement 100.000 MPs/L, nombre bien trop petit pour affecter les niveaux que nous mesurons qui sont dans les 10.000.000. Mais (1) peut-être que le système de double filtration libère plus de particules que cela, et (2) peut-il y a beaucoup plus de particules $<1\mu\text{m}$ libérées que cela.

Dans nos résultats, le nombre total de MPs est considérablement augmenté après LDL-aphérèse (sur échantillons frais) chez tous les patients, même ceux chez qui les EMP et PMP sont diminués après LDL-aphérèse. Peut-être que cela s'explique par la libération de particules à partir des colonnes? Ceci pourrait affecter le nombre total, mais ne devrait pas affecter les comptages de PMP et EMP parce que la méthode pour ces derniers est beaucoup plus précise qu'un comptage direct de toutes les particules d'une certaine taille.

Si notre but est d'identifier une baisse à long terme des MPs avec la LDL-aphérèse secondaire par rapport à diminuer les LDL, plutôt que toute diminution importante qui peut ou ne peut pas se produire avec un traitement? Si oui, devrait-on seulement cibler les nouveaux patients en traitement LDL-aphérèse (un processus lent!) afin que leurs MPs ne soient évaluées sur une plus longue période de temps? L'effet de confusion de la concurrence avec les statines pourraient être ajustés en se référant aux données sur les patients non-aphérèse dans l'étude des MPs.

Différents travaux rapportent l'impact variable de différents systèmes d'aphérèse, de filtration ou déplétion leucocytaire, sur le nombre et la composition des microparticules, suivant les contraintes de cisaillement mises en jeu ou la biocompatibilité des surfaces étrangères en contact avec les cellules sanguines ().

3.1.3 Rôle potentiel des microparticules en transfusion

La transfusion de produits sanguins labiles s'accompagne d'un apport de microparticules au patient, qui se traduit par une élévation significative des taux de microparticules circulantes. Bien que le devenir de ces microparticules soit peu étudié, une étude récente rapporte que la demi-vie des microparticules plaquettaires apportées par une transfusion de plaquettes d'aphérèse chez des patients thrombocytopéniques est inférieure à six heures dans la circulation périphérique (). Cette clairance rapide est liée à l'expression de phosphatidylsérine qui constitue un signal efficace pour l'élimination des microparticules par les cellules phagocytaires. Elle peut également résulter de diverses interactions adhésives, dépendantes de la P-sélectin, avec les cellules circulantes ou la surface endothéliale. Malgré leur élimination rapide, les microparticules apportées par la transfusion et chargées de multiples composants bioactifs sont susceptibles d'interférer avec diverses réponses biologiques chez le patient receveur. Les conséquences précises de cette surcharge de microparticules sont encore très mal connues mais suscitent une attention croissante. Une relation significative a été récemment démontrée entre la durée de conservation des concentrés érythrocytaires et la morbidimortalité de patients transfusés pour chirurgie cardiaque. Ce lien entre la fréquence de survenue de complications transfusionnelles et la conservation longue des produits sanguins amène à s'interroger sur le rôle potentiel des microparticules ().

3.2. Limites de notre étude :

Nous avons clairement besoin de distinguer le type de MPs que nous mesurons. L'objectif principal était de se concentrer sur les microparticules endothéliales et il est clair qu'avec nos observations les résultats obtenus sont variables. Il se pourrait bien que les variations soient dépendantes du temps et du type de traitement (alimentation, prise de médicaments, LDL-aphérèse).

Nous devons ajouter à cette étude plus de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale et de sujets témoins afin d'analyser plus en détails ces premiers résultats.

F- MESURE DE LA CINÉTIQUE DE LA C-REACTIVE PROTEINE (CRP) PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE CHEZ DES PATIENTS VOLONTAIRES OBESES AVANT ET APRES PERTE DE POIDS (Projet n°3)

I- Rationnel et objectif de l'étude de la cinétique de la CRP

1. Principe d'une étude de cinétique

Les études de cinétique permettent d'étudier le métabolisme *in vivo* des lipoprotéines, c'est-à-dire leur taux de production (PR) et leur taux de catabolisme fractionnel (FCR). Même si les résultats obtenus de ces études ne sont pas parfaits et incluent certains biais et approximations, les études de cinétique sont le meilleur moyen d'obtenir des détails précis sur le métabolisme des lipoprotéines chez l'humain, *in vivo*.

1.1 Marquage des lipoprotéines

Le principe général du marquage est de marquer la lipoprotéine (le tracé) à l'aide d'un traceur qui n'interférera pas avec le métabolisme normal du tracé et qui permet de détecter et de mesurer facilement le marqueur. Dans les études de cinétique des lipoprotéines, deux types de marquage sont utilisés : le marquage exogène et le marquage endogène. Le marquage exogène, dans le cas des lipoprotéines, consiste à prélever du sang du sujet, à isoler les lipoprotéines, de les marquer (habituellement à l'aide d'iode 125 ou d'iode 131), de les réinjecter au patient, de prélever à nouveau du sang et d'analyser les échantillons en mesurant le taux de désintégration nucléaire des isotopes non-stables (). Cette technique pose cependant un certain nombre de problèmes. En effet, plusieurs manipulations doivent être effectuées sur les lipoprotéines avant d'être réinjectées au sujet, introduisant la possibilité d'une contamination infectieuse ou chimique des échantillons. De plus, cette technique utilise habituellement des isotopes radioactifs qui posent eux-mêmes un certain nombre de problèmes, tels que l'exposition des sujets aux radiations, la possibilité de modifications des lipoprotéines par les radiations venant ainsi altérer leur métabolisme, la nécessité de grands volumes pour l'analyse des échantillons et les manipulations devant être effectuées rapidement, la demi-vie des radio-isotopes étant habituellement assez courte (par exemple : 7 jours pour l'iode 131 et 60 jours pour l'iode 125). De plus, dû au risque relié à leur utilisation interne, l'utilisation des isotopes radioactifs chez l'humain pose des problèmes éthiques. Le principal avantage de cette méthode est son faible coût ().

Le marquage endogène des lipoprotéines présente un certains nombres d'avantages par rapport au marquage exogène. Cette technique implique généralement l'administration au sujet d'un acide aminé marqué à l'aide d'un isotope stable, habituellement le deutérium ou le carbone 13. Les acides aminés utilisés sont habituellement la leucine ou la lysine. Ces deux acides aminés sont des acides aminés essentiels qui ne sont pas synthétisés chez l'humain et, de plus, ces deux acides aminés sont les seuls, chez l'humain, qui ne peuvent servir de précurseurs directs à la néoglucogénèse. Ces deux caractéristiques servent donc à stabiliser le pool plasmatique de marqueur, puisque le pool de marqueur ne peut être modifié par des acides aminés nouvellement synthétisés ou par leur trop grande utilisation pour autre chose que la synthèse protéique (). Dans le marquage endogène, c'est donc le corps humain qui procède au marquage des lipoprotéines en introduisant des acides aminés marqués lors de la synthèse protéique. Il est à noter que toutes les protéines synthétisées se retrouvent marquées, pas seulement les apolipoprotéines, et toutes ces protéines peuvent faire l'objet d'une étude de cinétique. Les avantages de cette méthode sont que la synthèse peut facilement être mesurée, il n'y a aucune exposition aux radiations, elle nécessite de faibles volumes pour l'analyse, elle permet de mesurer simultanément la cinétique de plusieurs protéines, elle permet l'utilisation simultanée de différents acides aminés marqués () et permet de procéder à plusieurs études consécutives chez un même sujet sans risque pour sa santé. Par contre, les techniques d'analyse sont beaucoup plus dispendieuses, et nécessitent un équipement plus sophistiqué (une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse) et il peut s'avérer difficile de générer un modèle tenant compte de l'entrée du traceur, la synthèse et la sécrétion des apolipoprotéines, puisqu'il s'agit d'un processus très complexe. De plus, l'action de certaines enzymes peut être affectée par la présence de neutrons supplémentaires dans la molécule de leucine. Par contre, afin de simplifier l'analyse déjà complexe des cinétiques et puisque l'action isotopique différentielle des différentes enzymes n'est généralement pas connue, nous supposons habituellement que l'action des enzymes sur le traceur est la même que sur le tracé.

1.2 Administration du traceur dans le marquage endogène

Deux principales approches sont utilisées pour administrer le traceur au sujet dans le cas du marquage endogène : en utilisant un bolus seul ou en utilisant un bolus suivi d'une infusion constante. Dans le cas d'un protocole avec bolus, une certaine quantité du traceur est administrée au début de l'étude et est suivie de prises de sang sur une période de temps assez

longue (96 heures, par exemple) (). Dans le cas d'un protocole avec bolus suivi d'une infusion constante, les prélèvements ne peuvent être effectués que pendant qu'il y a infusion, forçant le sujet à demeurer à la clinique et forçant ainsi des durées d'étude plus courtes. Ainsi, l'utilisation d'un bolus seul est préférable pour les apo ayant une demi-vie plasmatique assez longue (apo A-I, apo A-II, apo C-III), alors que l'utilisation du bolus suivi d'une infusion constante peut être utilisée pour mesurer les paramètres cinétiques des apo ayant un métabolisme rapide (apoB-48, apoB-100). Également, le bolus seul ne demande qu'une petite quantité de marqueur par rapport à la seconde approche, ce qui réduit les coûts.

1.3 Modélisation mathématique

Les résultats obtenus par spectrométrie de masse nous permettent de produire des courbes d'enrichissement du pool d'intérêt en fonction du temps. Ces courbes peuvent être produites en utilisant l'enrichissement (E) :

$$E = \frac{\textit{Traceur}}{\textit{Traceur} + \textit{Tracé}} \times 100$$

ou le ratio du traceur au tracé (TTR) :

$$TTR = \frac{\textit{Traceur}}{\textit{Tracé}} \times 100$$

Selon des opinions récentes, des spécialistes de la modélisation mathématique pensent qu'il est plus juste d'utiliser l'enrichissement au lieu du TTR ().

La modélisation mathématique des études de cinétique permet de représenter ce qui se passe métaboliquement lorsque le traceur entre en circulation. En effet, après injection du traceur, celui-ci va d'abord s'équilibrer dans la circulation, puis va s'équilibrer avec les liquides dans l'espace interstitiel, puis avec le cytoplasme des cellules. Les acides aminés marqués vont ensuite être incorporés dans les protéines qui seront sécrétées par la cellule à un certain taux et qui seront catabolisées à un autre taux. Les modèles multicompartimentaux permettent de tenir compte de ces étapes d'équilibrage et ensuite de suivre les protéines marquées lors de leur passage d'un pool à l'autre. Puisqu'il est impossible de mesurer tous les paramètres métaboliques d'un corps humain, le principal problème des études de cinétique est qu'il faut procéder à un certain nombre d'estimations et d'approximations afin d'être capable

de modéliser les données. La première assumption est de décider de l'allure du modèle. Les modèles simples ne comptent habituellement qu'un ou deux compartiments pour chaque classe de lipoprotéines, alors que les modèles complexes peuvent en compter plusieurs. Le choix repose habituellement sur le fait que le modèle doit fournir une réponse unique et que cette réponse doit être fournie de la manière la plus simple possible. De plus, les modèles simples demandent habituellement un petit nombre d'approximations, alors qu'il faut approximer un plus grand nombre de variables dans les modèles complexes afin de permettre au logiciel de modélisation d'être capable de fournir une solution. Ainsi, le choix du modèle se fait souvent selon que si le logiciel est capable de fournir une solution unique à partir des données. Le logiciel utilisé est SAAM II. Les Figures _ et _ présentent le modèle pour la cinétique de l'apoB-100 et de l'apoB-48 qui est aussi réalisée au sein du laboratoire (MRF).

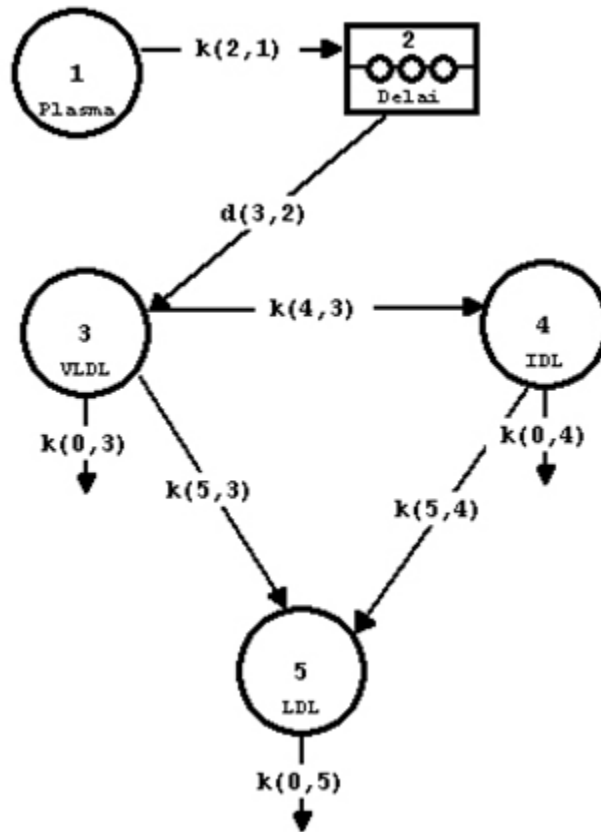


Figure 26 : Modèle utilisé pour la modélisation de la cinétique de l'apoB-100

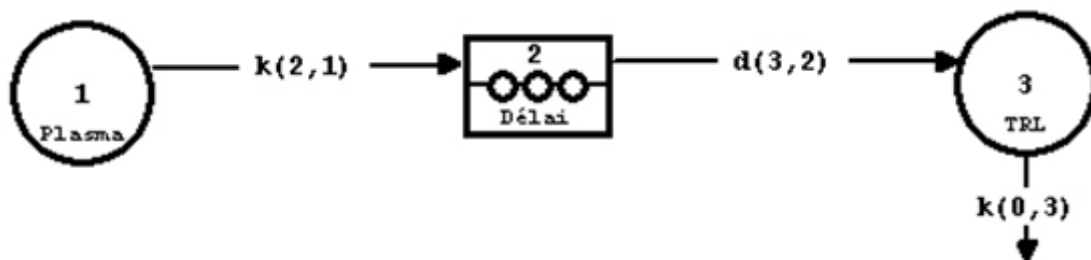


Figure 27 : Modèle utilisé pour la modélisation de la cinétique de l'apoB-48

Le compartiment 1 représente dans les deux cas le pool plasmatique de leucine deutérée, qui entre dans le compartiment 2, qui représente le délai d'assemblage et de sécrétion de la protéine et de la lipoprotéine. Pour le modèle de l'apoB-100, les compartiments 3, 4 et 5 représentent les VLDL, les IDL et les LDL, respectivement. La flèche $k(2,1)$ représente le passage de la leucine marquée du pool plasmatique au pool cellulaire. La flèche $k(3,2)$ représente la sécrétion du VLDL. Les flèches $k(4,3)$, $k(5,3)$ et $k(5,4)$ représentent le passage de l'apoB-100 d'un pool à l'autre, lors de son hydrolyse. Les flèches $k(0,3)$, $k(0,4)$ et $k(0,5)$ représentent la perte irréversible des protéines lors de leur catabolisme. Pour le modèle de l'apoB-48, le compartiment 3 représente les TRL. La flèche $k(2,1)$ représente le passage de la leucine marquée du pool plasmatique au pool cellulaire. La flèche $k(3,2)$ représente la sécrétion du CM. La flèche $k(0,3)$ représente la perte irréversible des protéines lors de leur catabolisme.

1. Protocole de l'étude cinétique

La c-réactive protéine (CRP) a été, depuis longtemps, largement utilisé comme un marqueur non-spécifique de la réponse de phase aiguë chez l'homme (). L'inflammation est de plus en plus reconnu pour jouer un rôle déterminant dans l'initiation et le développement de l'athérosclérose, à l'origine des maladies cardiovasculaires (MCV) dans les pays industrialisés (). La valeur prédictive des concentrations de CRP plasmatique mesurée par un dosage très sensible comme facteur de risque des MCV, a été étudiée dans plusieurs études épidémiologiques. Ces études ont été relativement consistantes en montrant que les individus

avec des niveaux élevés de CRP (3,0 mg/L) étaient plus à risque de maladies cardiovasculaires, comparativement aux personnes avec de faibles taux de CRP (1,0 mg/L), et ceci indépendamment du sexe (). Toutefois, des études récentes ont abouti à des données moins concluantes sur la valeur ajoutée de la CRP pour prédire le risque de MCV, comparé aux facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels tels que les lipoprotéines de basse densité (LDL) et le cholestérol ().

II- Matériel et Méthodes

2. Echantillons biologiques

Tableau 2 : Caractéristiques cliniques et biochimiques, avant et après perte de poids, des 6 patients issus du recrutement pour cette étude.

		EI 13	EI 23	EI 34	EI 60	EI 66	EI 72
	Name	Gary P.	Bevan A.	Roland H.	Malcolm B.	Maureen B.	Suzanne F.
	Gender	M	M	M	M	W	W
	Age (yr)	66	65	42	49	55	60
	Height (cm)	178	175	179	179	162,5	176
3 weeks	Weight (kg)	121,2	90,8	93,4	127	83,9	114,4
	BMI (kg/m ²)	38,25	29,65	29,15	39,64	31,73	36,93
	Waist (cm)	126,4	101	98	121,5	92	121,5
	Cholesterol total (mmol/l)	5,8	5,5	7,1	5,1	6,3	5,8
	LDL cholesterol (mmol/l)	3,83	3,62	4,88	3,19	3,39	3,79
	HDL cholesterol (mmol/l)	0,78	1,16	0,87	1,12	2,33	1,1
	Triglyceride (mmol/l)	2,8	1,9	3	1	0,8	2,2
	Glucose (mmol/l)	5,9	5,1	5,7	5,9	5,5	5,4
	CRP (mg/liter)	3,35	2,69	3,52	4,01	1,97	3,29
	Insulin (mU/l)	25	6,5	12	10	9	19
	HOMA score	6,56	1,47	3,04	2,62	2,2	4,56
13 weeks	Weight (kg)	115,9	88	90,5	112,2	79,7	110,8
	BMI (kg/m ²)	36,58	28,73	28,25	35,02	30,18	35,77
	Cholesterol total (mmol/l)	4,4	5,2	6,6	4,8	6,3	6,2
	LDL cholesterol (mmol/l)	2,79	3,36	4,66	3,32	3,63	4,11
	HDL cholesterol (mmol/l)	0,7	1,02	0,86	1,46	2,55	1,01
	Triglyceride (mmol/l)	1,82	1,5	2,35	0,8	0,75	2,18
	Glucose (mmol/l)	6,2	5,5	6	5,6	5,6	5
	CRP (mg/liter)	3,01	0,72	1,32	3,68	1,61	2,55
	Insulin (mU/l)	19	5	9	7	6	21
HOMA score	5,24	1,22	2,4	1,74	1,49	4,67	

2. Principe de la mesure de la C-reactive protéine

La C reactive protéine est composée de 5 sous-unités identiques de 23 kDa associées de façon non covalente. Il s'agit d'une protéine non spécifique de la phase aiguë de l'inflammation et se trouve à une concentration médiane de 0.8mg/mL chez des jeunes adultes en bonne santé. La CRP est extraite par chromatographie d'affinité en utilisant l'affinité différentielle de la CRP pour la phosphoéthanolamine (haute affinité) et sa plus grande affinité avec la phosphorylcholine. Elle est ensuite purifiée par migration sur un gel SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*). La bande de CRP est alors transférée par

western-blot sur une membrane PVDF. La bande de CRP est excisée et hydrolysée dans HCl 6M à 110 ° C pendant 24h. Les acides aminés subissent une derivatisation avec 1:1 d'acide trifluoroacétique et d'anhydride trifluoroacétique pour former des dérivés d'oxazolidinone. Les dérivés sont mesurés par GCMS avec ionisation chimique d'ions négatifs.

3. Méthodes d'analyse

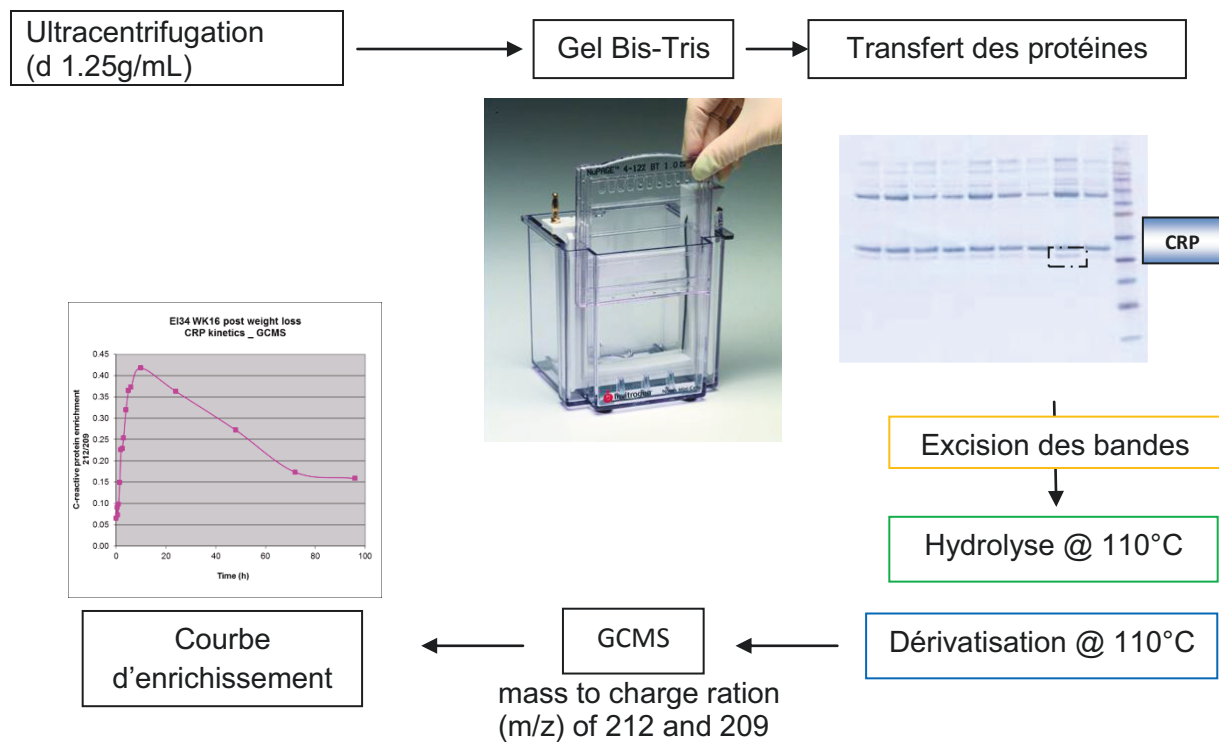


Figure 28 : Méthode d'analyse de la protéine CRP

3.1 Isolement de la c-réactive protéine (CRP) (Figure 28)

La densité des plasmas utilisés (>1.0 mL) a été ajustée à 1.25 g/mL avec différentes solutions de chlorure de sodium ou bromure de sodium et a subi des ultracentrifugations séquentielles avec un rotor de type 50.4Ti (Beckman) à 50 000 rpm à 4°C de 8 à 48 heures. Toutes les lipoprotéines de densité <1.25 g/mL ont été retirées en éliminant le surnageant puis la fraction de plasma à d>1.25 g/mL a été concentrée, avant dialyse, dans un tube de centrifugation avec un filtre de type Amicon Ultra-4 10K. Puis, l'EDTA a été éliminé des échantillons avec l'étape de dialyse des échantillons pendant 2 jours dans un tampon Tris. Le dessalage est nécessaire (après ultracentrifugation) pour enlever les sels ou quand on suspecte la présence d'EDTA, qui par couplage avec le calcium interfère dans le protocole. Enfin, la protéine CRP a été purifiée par chromatographie d'affinité à partir de la fraction plasmatique de densité supérieure à 1.25 g/mL

3.1.1 Couplage du ligand de la c-réactive protéine

La fraction de plasma $d > 1.25 \text{ g/mL}$ sans EDTA a été ensuite incubée avec $75 \mu\text{L}$ de phosphoethanolamine pH 8 afin d'être immobilisée de manière covalente aux billes de la résine activée CH-Sepharose (activated CH sepharose 4B #17-04890-01, GE Healthcare BioSciences) dans le tampon de couplage Tris-calcium [140 mM NaCl , 10 mM Tris , 10 mM CaCl_2 (pH 8)] pendant 45 min sur un agitateur rotatif à température ambiante. (Instructions pour la préparation de la résine 71-7088-00 AE de GE Healthcare)

Après cela, la résine a été lavée avec précaution avec un tampon Tris-calcium ($3 \times 0.5 \text{ mL}$) et la protéine CRP a été éluée spécifiquement en utilisant 20 mM de phosphorylcholine dans un tampon Tris-calcium.

3.1.2 Electrophorèse SDS-PAGE

Les protéines récupérées ont ensuite été soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%) Bis-Tris NuPAGE à 200 V pendant 45 min.

Une coloration au bleu de Coomassie et le dépôt sur le gel de la protéine CRP pure (Fitzgerald Industries International) dans un puit control ont permis d'identifier la bande correspondante aux monomères de la protéine CRP isolée.

3.1.3 Transfert de la protéine CRP par western-blot

Le transfert des protéines sur une membrane PVDF a été réalisé à 30 V pendant 1h dans le tampon de transfert 1X NuPAGE avec 20% de méthanol. Les membranes ont été ensuite colorées avec une solution d'Amido Black et décolorées dans du méthanol.

Le transfert immunologique de la protéine CRP et l'analyse de la carte peptidique massique de la protéine (peptide mass fingerprint analysis MALDI-TOF/MS) ont été utilisés respectivement pour confirmer l'absence de la protéine CRP dans les autres fractions du plasma et la pureté de la protéine CRP isolée.

Les concentrations de la protéine CRP dans la fraction de plasma $> 1.25 \text{ g/mL}$ sont systématiquement plus faibles que les concentrations de la CRP dans le plasma total (récupération de moyenne $58 \pm 22 \%$), mais une corrélation importante a été observée entre les 2 concentrations ($R^2=0.934$, $p < 0.0001$). Ce résultat atteste que la perte dans la récupération de la fraction $d > 1.25 \text{ g/mL}$ n'était pas liée à une perte d'un groupement spécifique intravasculaire de la CRP.

Une équation de régression linéaire a été utilisée pour ajuster les valeurs de la fraction >1.25 g/mL pour un retour aux concentrations de plasma : $CRP_{\text{plasma}} \text{ corrigé (milligramme par litre)} = 1.558 CRP_{d>1.25} + 0.117$, où 1.558 et 0.117 représentent, respectivement la pente et l'intersection de la droite de régression entre la CRP mesurée dans le plasma et la fraction de densité $d>1.25$ g/mL.

3.2 Mesures de l'enrichissement isotopique

3.2.1 Hydrolyse, dérivatisation et GCMS

Les bandes de la membrane PVDF contenant la protéine CRP ont été hydrolysées dans l'HCl 6N à 110°C pendant 24h.

Les acides aminés récupérés ont été dérivés en utilisant une solution 1:1 d'acide trifluoroacétique (TFA) et de l'anhydride trifluoroacétique (TFAA) et un ratio isotopique de la leucine a été déterminé à chaque temps de cinétique par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, en utilisant un seul ion comme contrôle (m/z 209 et 212).

III- Résultats et Discussion

1. Résultats

Cf p 97 à 99

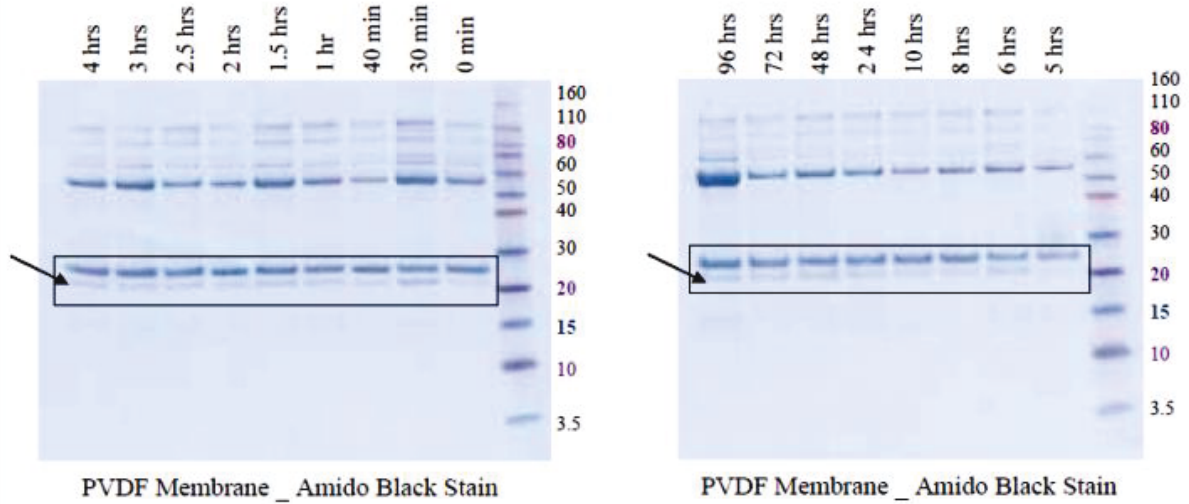
2. Discussion

Ces résultats montrent qu'il est possible de mesurer le turnover de la CRP dans le plasma à l'aide d'isotopes stables et de la spectrométrie de masse, les résultats suggèrent que la perte de poids diminue le rendement hépatique de la CRP, mais des travaux complémentaires sont nécessaires.

EI 13 G. Philips WKO

Subject with high concentration : 3.35

Nupage Novex 10% Bis-Tris Nu PAGE gel, 10 well, 1.5mm



Time (h)	Correlation Area		212/209
	212	209	
0	294	340712	0.09
30min	545	714702	0.08
40min	427	425746	0.10
1 h	808	768095	0.11
1.5 h	1242	438514	0.28
2 h	965	436211	0.22
2.5 h	1786	452559	0.39
3 h	1127	220360	0.51
4 h	1401	264739	0.53
5 h	612	138020	0.44
6 h	2041	416210	0.49
8 h	1334	266209	0.50
10 h	1431	383434	0.37
24 h	886	261021	0.34
48 h	895	334479	0.27
72 h	595	291465	0.20
96 h	375	263617	0.14

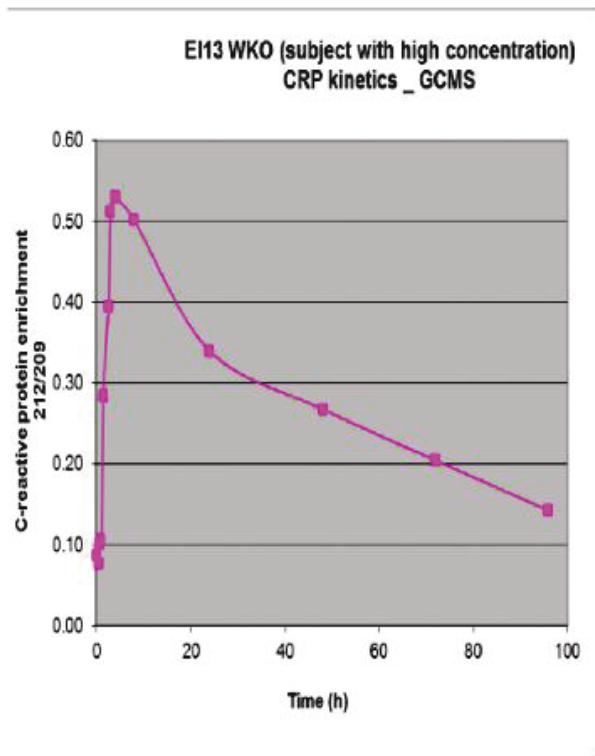
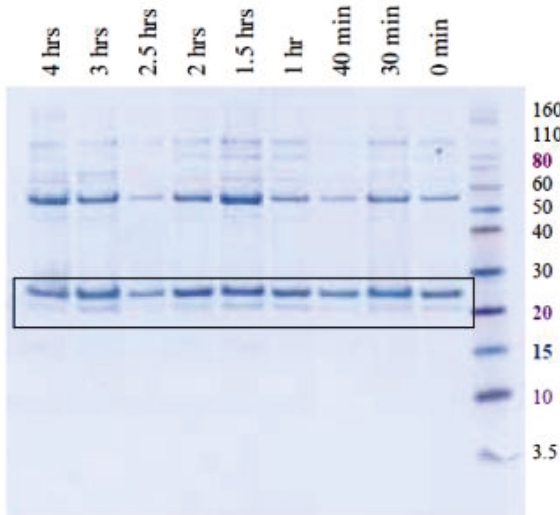


Figure 29 : Résultats de la courbe des mesures d'enrichissement de la protéine CRP sur les échantillons avant perte de poids du patient EI13.

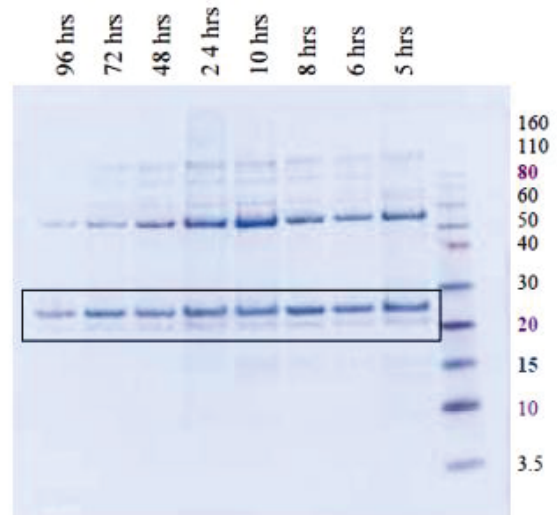
EI 13 G. Philips WK6

Subject with high concentration; post weight loss : 3.01

Nupage Novex 10% Bis-Tris Nu PAGE gel, 10 well, 1.5mm



PVDF Membrane _ Amido Black Stain



PVDF Membrane _ Amido Black Stain

Time (h)	Correlation Area		212/209
	212	209	
0	216	211646	0.10
30min	328	286429	0.11
40min	226	166858	0.14
1 h	441	186935	0.24
1h30	1617	441739	0.37
2 h	1080	241376	0.45
2h30	447	137739	0.32
3 h	4244	655917	0.65
4 h	1405	197095	0.71
5 h	3248	342117	0.95
6 h	1589	150537	1.06
8 h	1951	227211	0.86
10 h	1892	181210	1.04
24 h	2259	521845	0.43
48 h	467	146938	0.32
72 h	326	124995	0.26
96 h	184	93003	0.20

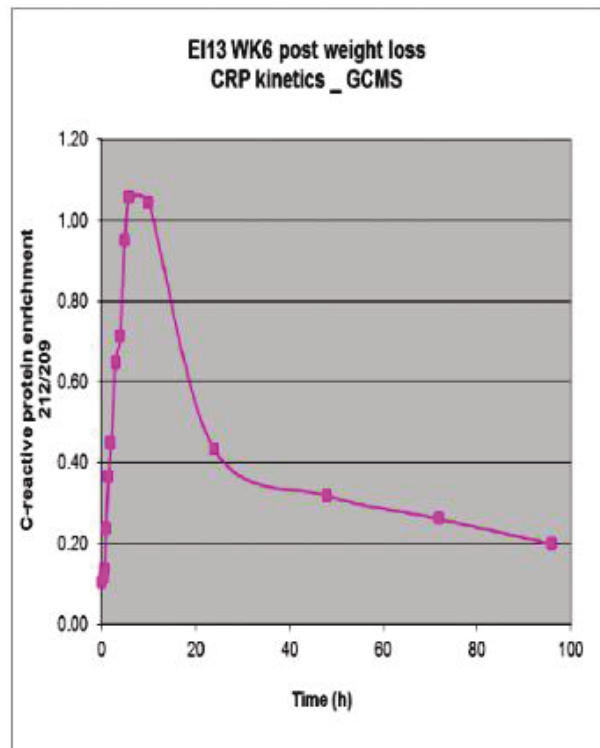


Figure 30 : Résultats de la courbe des mesures d'enrichissement de la protéine CRP sur les échantillons après perte de poids du patient EI13.

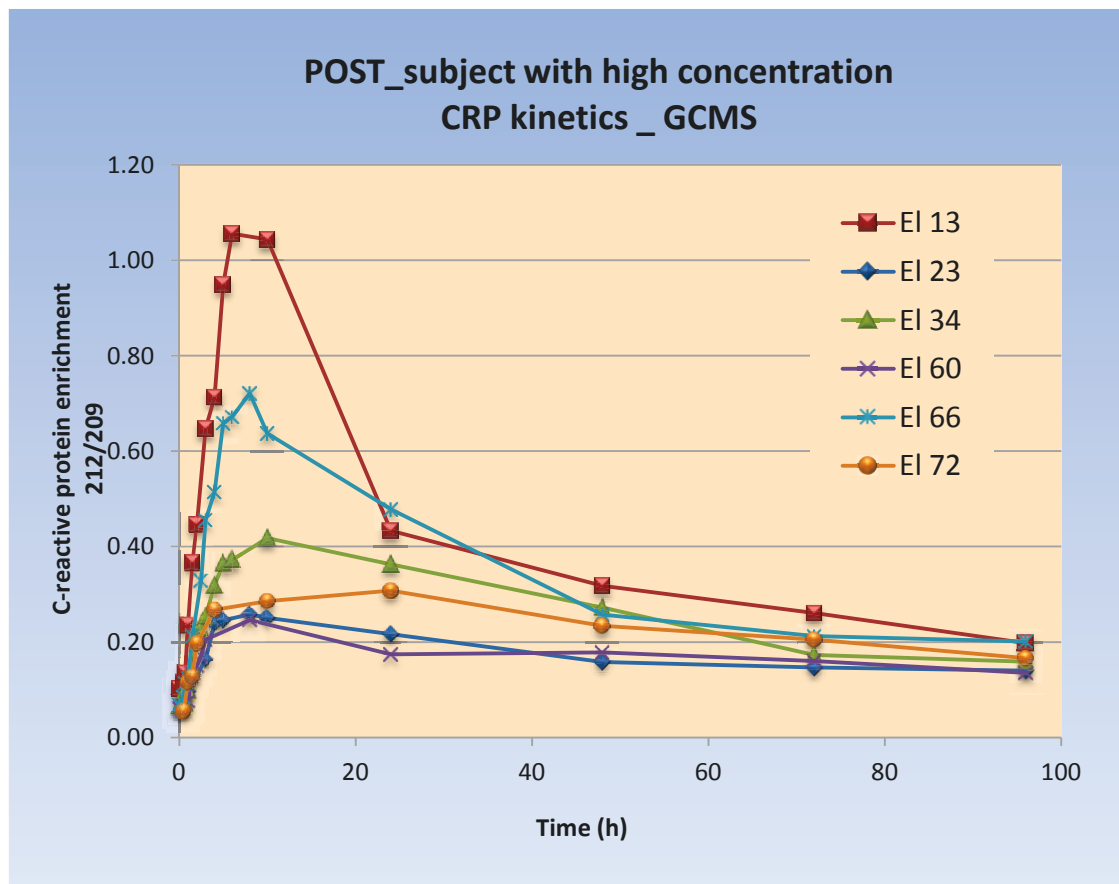
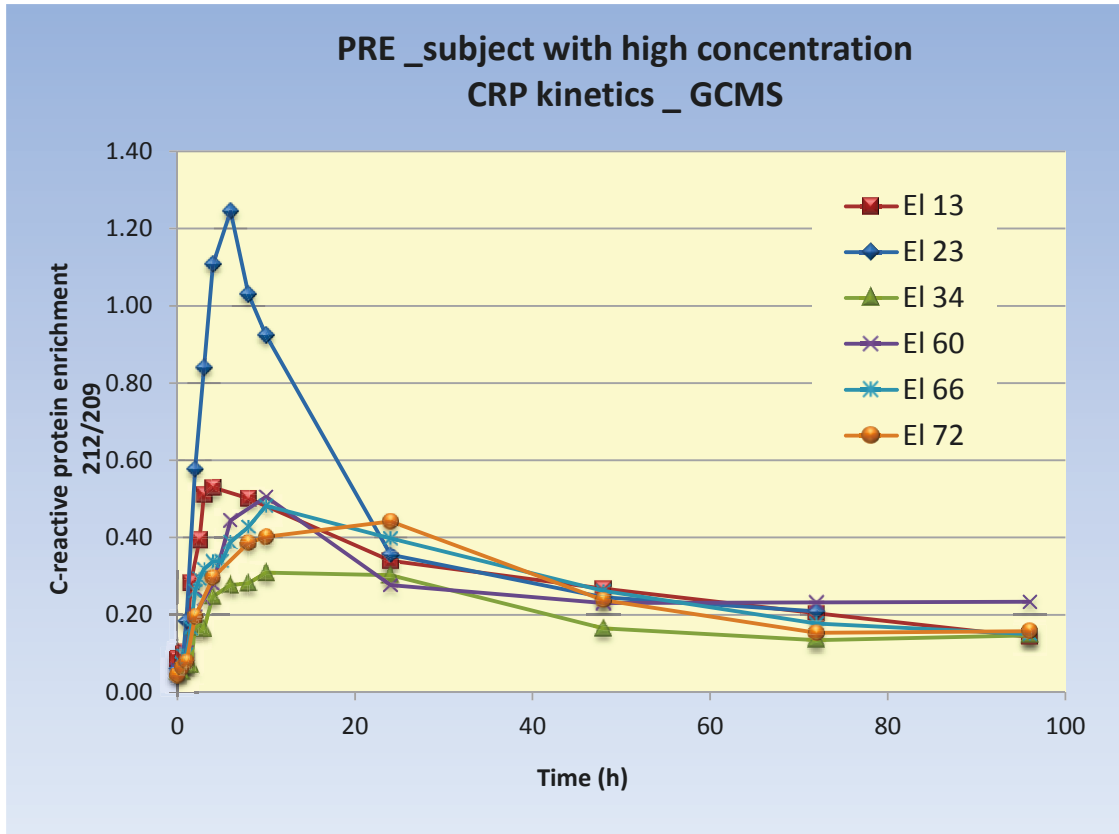


Figure 31 : Bilan des courbes d'enrichissement de la protéine CRP sur les échantillons avant et après perte de poids des 6 patients de l'étude.

G- CONCLUSION

Le premier projet dans ce mémoire d'ingénieur concernait la mesure des concentrations de pré- β HDL. Celui-ci a clairement démontré que les pré- β HDL sont très instables dans le plasma et que leur concentration est tributaire de l'utilisation d'inhibiteur des enzymes LCAT et LPL : ces résultats sont techniquement importants et seront intégrés dans une vaste publication.

La deuxième étude impliquait la mesure des microparticules circulantes par cytométrie en flux chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale subissant un traitement LDL-aphérèse. Les résultats ont montré que l'aphérèse peut diminuer la concentration de microparticules totales dans le plasma, mais quatre sujets seulement ont été étudiés et des travaux supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'importance de cette première tendance.

Le troisième projet concernait la mesure de la cinétique de la protéine CRP en utilisant la spectrométrie de masse chez des volontaires obèses avant et après la perte de poids. Dans cette étude, j'ai montré qu'il est possible de mesurer le turnover de la CRP dans le plasma à l'aide d'isotopes stables et de la spectrométrie de masse, les résultats suggèrent que la perte de poids diminue le rendement hépatique de la CRP, mais des travaux complémentaires sont nécessaires.

La dernière étude est probablement la plus importante et constituera la base d'une importante publication. Collectivement, les résultats se sont révélés informatifs, des travaux supplémentaires sont nécessaires.

Les perspectives immédiates sont d'approfondir ces recherches, pour apporter de nouvelles valeurs, afin de pouvoir disposer de suffisamment d'informations pour confirmer ou non ces premiers résultats.

H- INTERETS DES BIOMARQUEURS DANS LES ESSAIS CLINIQUES

Les coûts de la phase de Recherche et Développement nécessaire à la mise sur le marché de nouveaux médicaments ne cessant d'augmenter de manière exponentielle, l'intérêt principal et direct des biomarqueurs est bien entendu de permettre comme la réduction de la durée et des coûts des essais cliniques.

Cet effet de réduction de la durée et des coûts des essais cliniques s'exerce :

- par la capacité des biomarqueurs a constitué des critères d'évaluation objectifs supplémentaires pour l'efficacité ou la toxicité, en plus des critères d'évaluation cliniques habituels permettant une meilleure sélection des candidats médicaments,
- par la capacité des biomarqueurs à différencier les patients pour lesquels le traitement en cours de développement représente un bénéfice et constitue ainsi des facteurs d'enrichissement de population,
- par la capacité de certains biomarqueurs a se substituer a un critère d'évaluation clinique nécessitant un suivi long et/ou coûteux pour être évalué.

Grace aux propriétés décrites ci-dessus, les biomarqueurs peuvent permettre a un promoteur de distinguer plus rapidement les composés chimiques ou biologiques n'apportant probablement pas un effet thérapeutique favorable afin d'arrêter au plus vite le développement. Ainsi, les ressources disponibles en terme humain et financier pourront être consacrées au développement d'autres composés identifiés comme pouvant probablement apporter un effet thérapeutique. De manière concomitante, le surplus d'informations collectées grâce aux biomarqueurs devrait permettre une diminution du taux d'échecs de programmes de développement, voire une diminution du taux d'essais cliniques non concluants, grâce a une meilleure mise en place à l'aide des informations rassemblées.

Il est ainsi admis que l'intégration de biomarqueur(s) au cours de la phase clinique du développement est un des moyens d'améliorer la compréhension du mécanisme d'action des molécules en cours de développement et de discerner les patients les plus à même d'en bénéficier. Dans la mesure du possible, il est alors souvent suggère d'inclure les biomarqueurs le plus précocement possible au cours de la phase clinique afin de pouvoir bénéficier au maximum des avantages liés a leur utilisation.

Les essais cliniques de phase I sont réalisés de manière conventionnelle dans la population générale ou chez des patients inclus selon des paramètres cliniques, voire pratiques, empiriques. Or, pour les essais cliniques de phase I destinés à étudier les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la nouvelle molécule et déterminer la dose maximale tolérée, le taux de réponses au traitement demeure souvent faible. Une analyse plus spécifique des caractéristiques moléculaires par les biomarqueurs pourrait améliorer les résultats grâce à une meilleure sélection des patients inclus dans ces essais cliniques de phase I. De la même manière, l'intégration concertée de biomarqueurs dans les essais de phase II, afin de mieux comprendre les caractéristiques des patients répondeurs au traitement, à l'aide de l'analyse de paramètres non cliniques, peut permettre une mise en place plus efficace des essais cliniques de phase III. Or, la réalisation des essais cliniques de phase III est, de loin, la phase la plus coûteuse du développement clinique.

Néanmoins, cette recommandation d'inclure précocement des biomarqueurs dans les essais cliniques se heurte parfois à des contraintes techniques telles que la disponibilité de méthodes de dosage satisfaisantes du biomarqueur au moment de la mise en place de ces essais cliniques de phase I ou II.

D'autre part, cette démarche n'est qu'en phase d'expérimentation et prête encore à discussion et à l'amélioration. Concernant l'intégration de biomarqueurs dans les essais cliniques de phase I, suite à la publication d'une méta-analyse de 2458 essais cliniques de phase I, certains scientifiques ont souligné le risque d'utilisation de méthodes de dosage de biomarqueurs non validées. De même, les coûts finaux pourraient être fortement augmentés comparativement à un essai conventionnel sans biomarqueur, des problèmes éthiques survenir avec la multiplication de gestes de prélèvement d'échantillons tels que des biopsies et surtout le développement de certaines thérapies efficaces pourrait être arrêté en raison d'une sélection incorrecte des patients guidée par les biomarqueurs.

Pour remédier à certaines de ces difficultés, de nombreux partenariats public-privé se sont constitués, généralement regroupés par pathologie ou aire thérapeutique, dans le but de développer puis de qualifier des biomarqueurs. C'est le cas en particulier des biomarqueurs de toxicité, au contexte d'utilisation étendu et pouvant être utilisés lors des phases cliniques précoces, voire lors de la phase préclinique : C.O.P.D. biomarker qualification consortium pour la broncho pneumopathie chronique obstructive, A.D.N.I. (Alzheimer Disease

Neuroimaging Initiative) pour la maladie d'Alzheimer, C.S.R.C. (Cardiac Safety Research Consortium), P.S.T.C. (Predictive Safety Testing Consortium)...

Mais l'intérêt de l'introduction des biomarqueurs dans les essais cliniques ne se limite pas à une réduction de la durée et des coûts des essais cliniques. De nombreux autres intérêts indirects en découlent. Il est désormais établi que tous les patients atteints d'une pathologie ne répondent pas tous de la même façon à un traitement, d'où le développement du concept de médecine personnalisée afin de rationaliser l'usage du médicament. Les gouvernements et les organismes payeurs accompagnent cette transition vers la médecine personnalisée. Ainsi, soumis à des restrictions budgétaires, les organismes de remboursement s'orientent vers une approche thérapeutique fondée sur le résultat : au Royaume-Uni notamment, certains traitements ne sont remboursés qu'à la condition qu'un effet thérapeutique soit démontré chez le patient par un test prédéfini pratiqué *a posteriori*. Cette pratique devrait se généraliser à l'avenir. Or, les biomarqueurs sont indissociables du concept de médecine personnalisée. La médecine personnalisée repose sur des thérapies ciblées et des outils tels que les biomarqueurs permettant de déterminer si le patient est susceptible de bénéficier du traitement ou si un autre traitement serait mieux adapté. Des biomarqueurs qui pourraient également être utilisés lors de tests prédéfinis pour établir *a posteriori* l'existence d'un effet thérapeutique chez le patient.

Le développement de traitements ciblant plus particulièrement des sous-populations définies grâce aux biomarqueurs devrait conduire à une meilleure efficacité et/ou à un profil d'effets secondaires réduit, d'où résulterait une meilleure observance aux traitements de la part des patients. Cet effet devrait se révéler en premier lieu dans le traitement des pathologies chroniques. Jusqu'à présent le nombre de données sur cet aspect est insuffisant mais une étude a par exemple démontré que le taux d'observance des patients à un traitement contre l'hypercholestérolémie, incluant une modification du style de vie et un traitement médicamenteux était de 86%, deux années après la première réalisation d'un test pour un biomarqueur pharmacogénomique, contre 38%, deux années après l'initiation au traitement chez des patients n'ayant pas eu à réaliser de test pour un biomarqueur pharmacogénomique.

I- BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PRE-BETA HDL

Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Cox CE, Batista MC, Schaefer EJ. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; **24(11)**: 2181-7.

Asztalos BF, Horvath KV, McNamara JR, Roheim PS, Rubinstein JJ, Schaefer EJ. Effects of atorvastatin on the HDL subpopulation profile of coronary heart disease patients. *J Lipid Res.* 2002; **43(10)**: 1701-7.

Asztalos BF, Roheim PS, Milani RL, Lefevre M, McNamara JR, Horvath KV, et al. Distribution of ApoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; **20(12)**: 2670-6.

Asztalos BF, Sloop CH, Wong L, Roheim PS. Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I-containing subpopulations. *Biochim Biophys Acta.* 1993; **1169(3)**: 291-300.

Barrans A, Jaspard B, Barbaras R, Chap H, Perret B, Collet X. Pre-beta HDL: structure and metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1996; **1300(2)**: 73-85.

Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 1981; **665(3)**: 408-19.

Clay MA, Barter PJ. Formation of new HDL particles from lipid-free apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* 1996; **7**: 1722-32.

Fielding PE, Kawano M, Catapano AL, Zoppo A, Marcovina S, Fielding CJ. Unique epitope of apolipoprotein A-I expressed in pre-beta-1 high-density lipoprotein and its role in the catalyzed efflux of cellular cholesterol. *Biochemistry.* 1994; **33(22)**: 6981-5.

Fournier N, Francone O, Rothblat G. Enhanced efflux of cholesterol from ABCA1-expressing macrophages to serum from type IV hypertriglyceridemic subjects. *Atherosclerosis.* 2003; **171(2)**: 287-93.

Hajj Hassan H, Blain S, Boucher B, Denis M, Krimbou L, Genest J. Structural modification of plasma HDL by phospholipids promotes efficient ABCA1-mediated cholesterol release. *J Lipid Res.* 2005; **46(7)**: 1457-65.

Hattori H, Kujiraoka T, Egashira T, Saito E, Fujioka T, Takahashi S, et al. Association of coronary heart disease with pre-beta-HDL concentrations in Japanese men. *Clin. Chem.* 2004; **50(3)**: 589-95.

- Kawano M, Miida T, Fielding CJ, Fielding PE. Quantitation of pre beta-HDL-dependent and nonspecific components of the total efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *Biochemistry*. 1993; **32(19)**: 5025-8.
- Kuivenhoven JA, de Grooth GJ, Kawamura H, Klerkx AH, Wilhelm F, Trip MD, Kastelein JJ. Effectiveness of inhibition of cholesteryl ester transfer protein by JTT-705 in combination with pravastatin in type II dyslipidemia. *Am J Cardiol*. 2005; **95(9)**: 1085-8.
- Kunitake ST, Mendel CM, Hennessy LK. Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. *J Lipid Res*. 1992; **33(12)**: 1807-16.
- Lee JY, Lanningham-Foster L, Boudyguina EY, Smith TL, Young ER, Colvin PL, et al. Prebeta high density lipoprotein has two metabolic fates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J Lipid Res*. 2004; **45(4)**: 716-28.
- Lee JY, Parks JS. ATP-binding cassette transporter AI and its role in HDL formation. *Curr Opin Lipidol*. 2005; **16(1)**: 19-25.
- Liang HQ, Rye KA, Barter PJ. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J Lipid Res*. 1994; **35**: 1187-99.
- Miida T, Kawano M, Fielding C J, Fielding P E. Regulation of the concentration of pre β high-density lipoprotein in normal plasma by cell membranes and lecithin-cholesterol acyltransferase activity. *Biochemistry*. 1992; **31**: 11112-7.
- Miida T, Miyazaki O, Nakamura Y, Hirayama S, Hanyu O, Fukamachi I, et al. Analytical performance of a sandwich enzyme immunoassay for pre beta 1-HDL in stabilized plasma. *J Lipid Res*. 2003; **44(3)**: 645-50.
- Miida T, Sakai K, Ozaki K, Nakamura Y, Yamaguchi T, Tsuda T, et al. Bezafibrate increases pre β 1-HDL at the expense of HDL2b in hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; **20**: 2428-33.
- Miida T, Yamada T, Yamadera T, Ozaki K, Inano K, Okada M. Serum amyloid A protein generates pre beta 1 high-density lipoprotein from alpha-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry*. 1999; **38(51)**: 16958-62.
- Miyazaki O, Kobayashi J, Fukamachi I, Miida T, Bujo H, Saito Y. A new sandwich enzyme immunoassay for measurement of plasma pre- β 1-HDL levels. *J Lipid Res*. 2000; **41**: 2083-8.
- Nambi V, Ballantyne CM. Fat, Fit, and Leading the Charge: The Evolution of Measuring High-Density Lipoprotein Subpopulations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; **25**: 2013 - 5.
- Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G., von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*. 2002; **161(1)**: 1-16.
- O'Connor P M, Zysow B R, Schoenhaus SA, Ishida BY. Prebeta-1 HDL in plasma of normolipidemic individuals: influences of plasma lipoproteins, age, and gender. *J Lipid Res*. 1998; **39**: 670-8.

- Okamoto H, Yonemori F, Wakitani K, Minowa T, Maeda K, Shinkai H. A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature*. 2000; **406(6792)**: 203-7.
- Pussinen PJ, Malle E, Metso J, Sattler W, Raynes JG, Jauhianen M. Acute-phase HDL in phospholipid transfer protein (PLTP)-mediated HDL conversion. *Atherosclerosis*. 2001; **155**: 297-305.
- Rader DJ. Regulation of reverse cholesterol transport and clinical implications. *Am J Cardiol*. 2003; **92(4A)**: 42J-9J.
- Ritter MC, Scanus AM. Role of apolipoprotein A-I in the structure of human serum high density lipoproteins. Reconstitution studies. *J Biol Chem*. 1977; **252(4)**: 1208-16.
- Rye KA, Barter PJ. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; **24(3)**: 421-8.
- Skinner ER. High-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol*. 1994; **5(3)**: 241-7.
- Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002; **161**: 245-54.
- Sviridov D, Pyle LE, Jauhianen M, Ehnholm C, Fidge NH. Deletion of the propeptide of apolipoprotein A-I reduces protein expression but stimulates effective conversion of prebeta-high density lipoprotein to alpha-high density lipoprotein. *J Lipid Res*. 2000; **41(11)**: 1872-82.
- Sviridov D; Miyazaki O, Theodore K, Hoang A, Fukamachi I, Nestel P. Delineation of the Role of Pre- β_1 -HDL in Cholesterol Efflux Using Isolated Pre- β_1 -HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; **22**: 1482.
- Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: new insights from molecular genetic studies. *J Intern Med*. 1995; **237(1)**: 5-12.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1979; **76 (1979)**: 4350-4.
- Wang N, Tall AR. Regulation and mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; **23**: 1178-84.
- Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis*. 1988; **8(6)**: 737-41.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

MICROPARTICULES

- Abid Hussein, M. N., A. N. Boing, E. Biro, F. J. Hoek, G. M. Vogel, D. G. Meuleman, A. Sturk and R. Nieuwland, "Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties", *Thromb Res* (2008) **121 (6)**: 865-71

Amabile, N., A. P. Guerin, A. Leroyer, Z. Mallat, C. Nguyen, J. Boddaert, G. M. London, A. Tedgui and C. M. Boulanger, "Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure", *J Am Soc Nephrol* (2005) **16** (11): 3381-8

Ardoin, S. P., J. C. Shanahan and D. S. Pisetsky, "The role of microparticles in inflammation and thrombosis", *Scand J Immunol* (2007) **66** (2-3): 159-65

Azevedo, L. C., M. A. Pedro and F. R. Laurindo, "Circulating microparticles as therapeutic targets in cardiovascular diseases", *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* (2007) **2** (1): 41-51

Bernard, S., R. Loffroy, A. Serusclat, L. Boussel, E. Bonnefoy, C. Thevenon, M. Rabilloud, D. Revel, P. Moulin and P. Douek, "Increased levels of endothelial microparticles CD144 (VE-Cadherin) positives in type 2 diabetic patients with coronary noncalcified plaques evaluated by multidetector computed tomography (MDCT)", *Atherosclerosis* (2009) **203** (2): 429-35

Biro, E., K. N. Sturk-Maquelin, G. M. Vogel, D. G. Meuleman, M. J. Smit, C. E. Hack, A. Sturk and R. Nieuwland, "Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner", *J Thromb Haemost* (2003) **1** (12): 2561-8

Boulanger, C. M., N. Amabile and A. Tedgui, "Circulating Microparticles: A Potential Prognostic Marker for Atherosclerotic Vascular Disease", *Hypertension* (2006) **48** (2): 180-186

Chirinos, J. A., G. A. Heresi, H. Velasquez, W. Jy, J. J. Jimenez, E. Ahn, L. L. Horstman, A. O. Soriano, J. P. Zambrano and Y. S. Ahn, "Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism", *J Am Coll Cardiol* (2005) **45** (9): 1467-71

Chironi, G., A. Simon, B. Hugel, M. Del Pino, J. Gariépy, J. M. Freyssinet and A. Tedgui, "Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects", *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2006) **26** (12): 2775-80

Chironi, G. N., A. Simon, C. M. Boulanger, F. Dignat-George, B. Hugel, J. L. Megnien, M. Lefort, J. M. Freyssinet and A. Tedgui, "Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling", *J Hypertension* (2009)

Dursun, I., H. M. Poyrazoglu, Z. Gunduz, H. Ulger, A. Yykylmaz, R. Dusunsel, T. Patyroglu and M. Gurgoze, "The relationship between circulating endothelial microparticles and arterial

stiffness and atherosclerosis in children with chronic kidney disease", *Nephrol Dial Transplant* (2009) **24 (8)**: 2511-8

Enjeti, A. K., L. F. Lincz and M. Seldon, "Detection and measurement of microparticles: an evolving research tool for vascular biology", *Semin Thromb Hemost* (2007) **33 (8)**: 771-9

Freyssinet, J. M. and F. Toti, "Formation of procoagulant microparticles and properties", *Thromb Res* **125** Suppl 1 S46-8

Freyssinet, J. M. and F. Dignat-George, "More on: Measuring circulating cell-derived microparticles", *J Thromb Haemost* (2005) **3 (3)**: 613-4

Goichot, B., L. Grunebaum, D. Desprez, S. Vinzio, L. Meyer, J. L. Schlienger, M. Lessard and C. Simon, "Circulating procoagulant microparticles in obesity", *Diabetes Metab* (2006) **32 (1)**: 82-5

Hagberg I.A, Ç.A. Akkøk, T. Lyberg, and J. Kjeldsen-Kragh, "Apheresis-induced platelet activation: comparison of three types of cell separators", *Transfusion* (2000) **40** : 182-192

Harrison P, Gardiner C. How to detect and measure microparticles. Hematology Education: *European Hematology Association* (2010) **4** : 51-56.

Hartvigsen, K., M. Y. Chou, L. F. Hansen, P. X. Shaw, S. Tsimikas, C. J. Binder and J. L. Witztum, "The role of innate immunity in atherogenesis", *J Lipid Res* (2009) **50** Suppl S388-93

Horstman, L. L., W. Jy, J. J. Jimenez and Y. S. Ahn, "Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction", *Front Biosci* (2004) **9**: 1118-35

Hugel, B., M. C. Martinez, C. Kunzelmann and J. M. Freyssinet, "Membrane microparticles: two sides of the coin", *Physiology (Bethesda)* (2005) **20**: 22-7

Janiszewski, M., A. O. Do Carmo, M. A. Pedro, E. Silva, E. Knobel and F. R. Laurindo, "Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway", *Crit Care Med* (2004) **32 (3)**: 818-25

Jimenez, J. J., W. Jy, L. M. Mauro, L. L. Horstman, C. J. Bidot and Y. S. Ahn, "Endothelial microparticles (EMP) as vascular disease markers", *Adv Clin Chem* (2005) **39**: 131-57

Lawrie AS, Albany A, Cardigan RA, Mackie IJ, Harrison P. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang* (2009) **96** (3): 206-12.

Leroyer, A. S., H. Isobe, G. Leseche, Y. Castier, M. Wassef, Z. Mallat, B. R. Binder, A. Tedgui and C. M. Boulanger, "Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques", *J Am Coll Cardiol* (2007) **49** (7): 772-7

Leroyer, A. S., P. E. Rautou, J. S. Silvestre, Y. Castier, G. Leseche, C. Devue, M. Duriez, R. P. Brandes, E. Lutgens, A. Tedgui and C. M. Boulanger, "CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization", *J Am Coll Cardiol* (2008) **52** (16): 1302-11

Leroyer, A. S., A. Tedgui and C. M. Boulanger, "Role of microparticles in atherothrombosis", *J Intern Med* (2008) **263** (5): 528-37

Lynch, S. F. and C. A. Ludlam, "Plasma microparticles and vascular disorders", *Br J Haematol* (2007) **137** (1): 36-48

Mackman, N., "The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis", *Anesth Analg* (2009) **108** (5): 1447-52

Mallat, Z., H. Benamer, B. Hugel, J. Benessiano, P. G. Steg, J. M. Freyssinet and A. Tedgui, "Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes", *Circulation* (2000) **101** (8): 841-3

Mause, S. F., P. von Hundelshausen, A. Zerneck, R. R. Koenen and C. Weber, "Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium", *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2005) **25** (7): 1512-8

Mayr, M., D. Grainger, U. Mayr, A. S. Leroyer, G. Leseche, A. Sidibe, O. Herbin, X. Yin, A. Gomes, B. Madhu, J. R. Griffiths, Q. Xu, A. Tedgui and C. M. Boulanger, "Proteomics, metabolomics, and immunomics on microparticles derived from human atherosclerotic plaques", *Circ Cardiovasc Genet* (2009) **2** (4): 379-88

Michelsen, A. E., A. T. Noto, E. Brodin, E. B. Mathiesen, F. Brosstad and J. B. Hansen, "Elevated levels of platelet microparticles in carotid atherosclerosis and during the postprandial state", *Thromb Res* (2009) **123** (6): 881-6

Mitsios, J. V., M. P. Vini, D. Stengel, E. Ninio and A. D. Tselepis, "Human platelets secrete the plasma type of platelet-activating factor acetylhydrolase primarily associated with microparticles", *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2006) **26 (8)**: 1907-13

Morel, O., B. Hugel, L. Jesel, Z. Mallat, F. Lanza, M. P. Douchet, M. Zupan, M. Chauvin, J. P. Cazenave, A. Tedgui, J. M. Freyssinet and F. Toti, "Circulating procoagulant microparticles and soluble GPV in myocardial infarction treated by primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. A possible role for GPIIb-IIIa antagonists", *J Thromb Haemost* (2004) **2 (7)**: 1118-26

Morel, O., F. Toti, B. Bakouboula, L. Grunebaum and J. M. Freyssinet, "Procoagulant microparticles: 'criminal partners' in atherothrombosis and deleterious cellular exchanges", *Pathophysiol Haemost Thromb* (2006) **35 (1-2)**: 15-22

Morel, O., P. Ohlmann, E. Epailly, B. Bakouboula, F. Zobairi, L. Jesel, N. Meyer, M. P. Chenard, J. M. Freyssinet, P. Bareiss, J. P. Mazzucotelli and F. Toti, "Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection", *J Heart Lung Transplant* (2008) **27 (1)**: 38-45

Nomura, S., A. Shouzu, S. Omoto, M. Nishikawa, S. Fukuhara and T. Iwasaka, "Losartan and simvastatin inhibit platelet activation in hypertensive patients", *J Thromb Thrombolysis* (2004) **18 (3)**: 177-85

Nomura, S., N. Inami, A. Shouzu, S. Omoto, Y. Kimura, N. Takahashi, A. Tanaka, F. Urase, Y. Maeda, H. Ohtani and T. Iwasaka, "The effects of pitavastatin, eicosapentaenoic acid and combined therapy on platelet-derived microparticles and adiponectin in hyperlipidemic, diabetic patients", *Platelets* (2009) **20 (1)**: 16-22

Osterud, B. and E. Bjorklid, "Sources of tissue factor", *Semin Thromb Hemost* (2006) **32 (1)**: 11-23

Paul, J.-L. and B. Baudin, "Physiopathologie de l'athérosclérose et marqueurs précoces", *Revue Francophone des Laboratoires* (2009) **29 (409)**: 50

Preston Richard A., Wenche Jy, Joaquin J. Jimenez, Lucia M. Mauro, Lawrence L. Horstman, Madelyn Valle, Gerard Aime, Yeon S. Ahn, "Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles", *Hypertension* (2003) **41(2)**: 211-7

Pfister, S. L., "Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery", *Hypertension* (2004) **43 (2)**: 428-33

Piccin, A., W. G. Murphy and O. P. Smith, "Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications", *Blood Rev* (2007) **21 (3)**: 157-71

Rank A., R. Nieuwland, S. Liebhardt, M. Iberer, S. Grützner, B. Toth and R. Pihusch, "Apheresis platelet concentrates contain platelet-derived and endothelial cell-derived microparticles", *Vox Sang* (2011) **100 (2)**: 179-86

Sabatier, F., V. Roux, F. Anfosso, L. Camoin, J. Sampol and F. Dignat-George, "Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity", *Blood* (2002) **99 (11)**: 3962-70

Simak, J., M. P. Gelderman, H. Yu, V. Wright and A. E. Baird, "Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome", *J Thromb Haemost* (2006) **4 (6)**: 1296-302

Tesse, A., M. C. Martinez, B. Hugel, K. Chalupsky, C. D. Muller, F. Meziani, D. Mitolo-Chieppa, J. M. Freyssinet and R. Andriantsitohaina, "Upregulation of proinflammatory proteins through NF-kappaB pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity", *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2005) **25 (12)**: 2522-7

Tramontano, A. F., J. O'Leary, A. D. Black, R. Muniyappa, M. V. Cutaia and N. El-Sherif, "Statin decreases endothelial microparticle release from human coronary artery endothelial cells: implication for the Rho-kinase pathway", *Biochem Biophys Res Commun* (2004) **320 (1)**: 34-8

VanWijk, M. J., E. VanBavel, A. Sturk and R. Nieuwland, "Microparticles in cardiovascular diseases", *Cardiovasc Res* (2003) **59 (2)**: 277-87

Werner, N., S. Wassmann, P. Ahlers, S. Kosiol and G. Nickenig, "Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease", *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2006) **26 (1)**: 112-6

Watts GF, van Bockxmeer FM, Bates T, Burnett JR, Juniper A, O'Leary P. A New Model of Care for Familial Hypercholesterolaemia from Western Australia: Closing a Major Gap in Preventive Cardiology. *Heart, Lung and Circulation* (2010) **19** : 419–422.

Wolf, P., "The nature and significance of platelet products in human plasma", *Br J Haematol* (1967) **13 (3)**: 269-88

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

C-REACTIVE PROTEINE

Agrawal A., et al., A C-reactive protein mutant that does not bind to phosphocholine and pneumococcal C-polysaccharide. *J Immunol*, 2002. **169(6)**: p. 3217-22.

Albert C.M., et al., Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation*, 2002. **105(22)**: p. 2595-9.

Ariyo A.A., C. Thach, and R. Tracy, Lp(a) lipoprotein, vascular disease, and mortality in the elderly. *N Engl J Med*, 2003. **349(22)**: p. 2108-15.

Bayes-Genis A., et al., Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 2001. **345(14)**: p. 1022-9.

Biasucci L.M., et al., Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation*, 1999. **99(7)**: p. 855-60.

Biasucci L.M., et al., Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation*, 1999. **99(16)**: p. 2079-84.

Black S., I. Kushner, and D. Samols, C-reactive Protein. *J Biol Chem*, 2004. **279(47)**: p. 48487-90.

Blake G.J. and P.M. Ridker, C-reactive protein and prognosis after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*, 2002. **23(12)**: p. 923-5.

Brewer H.B., Jr., High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24(3)**: p. 387-91.

Brull D.J., et al., Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23(11)**: p. 2063-9.

Chan DC, Watts GF, Gan SK, Ooi EM, Barrett PH., Effect of ezetimibe on hepatic fat, inflammatory markers, and apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant obese subjects on a weight loss diet. *Diabetes Care*, 2010. **33(5)**: p. 1134-9.

Chan DC, Watts GF, Barrett PH, Beilin LJ, Mori TA., Effect of atorvastatin and fish oil on plasma high-sensitivity C-reactive protein concentrations in individuals with visceral obesity. *Clin Chem*. 2002. **48(6 Pt 1)**: p. 877-83.

Chang M.K., et al., C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99(20)**: p. 13043-8.

Dessein P.H., B.I. Joffe, and A.E. Stanwix, High sensitivity C-reactive protein as a disease activity marker in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 2004. **31(6)**: p. 1095-7.

Diehl E.E., et al., Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue. *Am J Med Sci*, 2000. **319(2)**: p. 79-83.

Gotto A.M., Jr., H.J. Pownall, and R.J. Havel, Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol*, 1986. **128**: p. 3-41.

Guilland J.C., et al., Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease? . *Pathol Biol (Paris)*, 2003. **51(2)**: p. 111-21.

Handy D.E. and J. Loscalzo, Homocysteine and atherothrombosis: diagnosis and treatment. *Curr Atheroscler Rep*, 2003. **5(4)**: p. 276-83.

Hatanaka K., et al., Immunohistochemical localization of C-reactive protein-binding sites in human atherosclerotic aortic lesions by a modified streptavidin-biotin-staining method. *Pathol Int*, 1995. **45(9)**: p. 635-41.

Hundt M., M. Zielinska-Skowronek, and R.E. Schmidt, Lack of specific receptors for C-reactive protein on white blood cells. *Eur J Immunol*, 2001. **31(12)**: p. 3475-83.

Ikonomidis I., et al., Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation*, 1999. **100(8)**: p. 793-8.

Inokubo Y., et al., Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J*, 2001. **141(2)**: p. 211-7.

Jager A., et al., Increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 are associated with risk of cardiovascular mortality in type 2 diabetes: the Hoorn study. *Diabetes*, 2000. **49(3)**: p. 485-91.

Kaftan A.H. and O. Kaftan, Coronary artery disease and infection with Chlamydia pneumonia. *Jpn Heart J*, 2000. **41(2)**: p. 165-72.

Kai H., et al., Peripheral blood levels of matrix metalloproteases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 1998. **32(2)**: p. 368-72.

Koenig W., Predicting risk and treatment benefit in atherosclerosis: the role of C-reactive protein. *Int J Cardiol*, 2005. **98(2)**: p. 199-206.

Lagrand W.K., et al., C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? *Circulation*, 1999. **100(1)**: p. 96-102.

Li S.H., et al., C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells. *Circulation*, 2004. **109(7)**: p. 833-6.

Liuzzo G., et al., The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med*, 1994. **331(7)**: p. 417-24.

Noji Y., et al., Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med*, 2001. **39(5)**: p. 380-4.

Packard C.J., et al., Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*, 2000. **343(16)**: p. 1148-55.

Pepys M.B., I.F. Rowe, and M.L. Baltz, C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins. *Int Rev Exp Pathol*, 1985. **27**: p. 83-111.

Ridker P.M., Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation*, 2003. **107(3)**: p. 363-9.

Ridker P.M., et al., Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*, 2002. **347(20)**: p. 1557-65.

Ridker P.M., et al., C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*, 2000. **342(12)**: p. 836- 43.

Ridker P.M., et al., C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation*, 2003. **107(3)**: p. 391-7.

Ridker P.M., et al., Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation*, 2004. **109(25 Suppl 1)**: p. IV6-19.

Ridker P.M., et al., Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, 2000. **101(15)**: p. 1767-72.

Ridker P.M., et al., Plasma homocysteine concentration, statin therapy, and the risk of first acute coronary events. *Circulation*, 2002. **105(15)**: p. 1776-9.

Ridker P.M., Inflammatory biomarkers, statins, and the risk of stroke: cracking a clinical conundrum. *Circulation*, 2002. **105(22)**: p. 2583-5.

Ridker P.M., J.E. Buring, and N. Rifai, Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation*, 2001. **103(4)**: p. 491-5.

Ridker P.M., M.J. Stampfer, and N. Rifai, Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *Jama*, 2001. **285(19)**: p. 2481-5.

Rifai N. and P.M. Ridker, High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin Chem*, 2001. **47(3)**: p. 403-11.

Siegel J., et al., Interactions of C-reactive protein with the complement system. II. Creactive protein-mediated consumption of complement by poly-L-lysine polymers and other polycations. *J Exp Med*, 1975. **142(3)**: p. 709-21.

Simon A.D., et al., Circulating levels of IL-1beta, a prothrombotic cytokine, are elevated in unstable angina versus stable angina. *J Thromb Thrombolysis*, 2000. **9(3)**: p. 217-22.

Szalai, A.J., et al., Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the CRP gene. *Genes Immun*, 2002. **3(1)**: p. 14-9.

Taskinen, S., et al., Binding of C-reactive protein to modified low-density-lipoprotein particles: identification of cholesterol as a novel ligand for C-reactive protein. *Biochem J*, 2002. **367(Pt 2)**: p. 403-12.

Thompson, D., M.B. Pepys, and S.P. Wood, The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure Fold Des*, 1999. **7(2)**: p. 169-77.

Torzewski, J., et al., C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18(9)**: p. 1386-92.

Van Berkel, T.J., et al., LDL receptor-independent and -dependent uptake of lipoproteins. *Atherosclerosis*, 1995. **118 Suppl**: p. S43-50.

Verma, S., P.E. Szmitko, and E.T. Yeh, C-reactive protein: structure affects function. *Circulation*, 2004. **109(16)**: p. 1914-7.

Volanakis, J.E., Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol*, 2001. **38(2-3)**: p. 189-97.

Wong A.T., Effect of laparoscopic sleeve gastrectomy on elevated C-reactive protein and atherogenic dyslipidemia in morbidly obese patients. *Clinical Biochemistry*, 2011. **44 (4)**: p342-344.

Woo P., J.R. Korenberg, and A.S. Whitehead, Characterization of genomic and complementary DNA sequence of human C-reactive protein, and comparison with the complementary DNA sequence of serum amyloid P component. *J Biol Chem*, 1985. **260(24)**: p. 13384-8.

Yasojima, K., et al., Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*, 2001. **158(3)**: p. 1039-51.

Zee, R.Y. and P.M. Ridker, Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis. *Atherosclerosis*, 2002. **162(1)**: p. 217-9.

Zethelius, B., et al., Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*, 2008. **358(20)**: p. 2107-16.

Zhang, Y.X., et al., Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1999. **145(2)**: p. 375-9.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :

La distribution en fonction de la taille et de la densité des principales classes de lipoprotéines humaines. (D'après Harrison's Principles of Internal Medicine, 18e édition, Dan L. Longo, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo, Eds.,2008).....4

Figure 2 :

Séparation des souspopulations de HDL par électrophorèse en deux dimensions. (adaptée de Schafer and Asztalos., *Am J Cardiol.* (2007)).....15

Figure 3 :

Modèle de pré β -HDL en 3D. 2 apoA-I tête-bêche forment une ceinture autour d'une pré- β HDL discoïdale, composée de phospholipides et de cholestérol libre. D'après Zannis *et al*, 2006.....16

Figure 4 :

Rôle de la PLTP dans le remodelage des HDL et le transport reverse du cholestérol (Alan R. Tall, Nan Wang , *J Clin Invest.* 2000).....19

Figure 5 :

Métabolisme des particules HDL. (Kwiterovich, 2000).....20

Figure 6 :

Schémas des différentes étapes de formation de la plaque athéromateuse.....23

Figure 7:

Principe de l'absorption des lipoprotéines (modifiée by Borberg *et al.*, 2009).....35

Figure 8 :

Structure en trois dimensions du pentamère de la CRP (Image adaptée de Paul Ridker, 2002). La protéine est constituée de cinq chaînes polypeptidiques identiques formant un anneau de cinq éléments.....37

Figure 9 :

Les différentes fonctions associées à la CRP. Modifié d'après DuClos *et al.*, 2003.....41

Figure 10 :

Études prospectives depuis 1996 liant le niveau de CRP et le risque de survenue d'un premier événement cardiovasculaire respectivement dans le cadre d'accidents vasculaires cérébraux, de maladies coronaires, de maladies cardiovasculaires, d'infarctus du myocarde et de maladies artérielles pulmonaires selon l'étude.(Modifiée d'après Ridker *et al.*, 2002).....43

Figure 11 :

Corrélation entre la concentration en CRP plasmatique et le risque d'accident cardiovasculaire chez des sujets apparemment en bonne santé (A) ou présentant un syndrome métabolique (B). (Modifiée d'après Ridker *et al.*, 2002).....44

Figure 12 :	
Survie sans événement cardiovasculaire évalué en fonction des taux initiaux de CRP et de LDL. Modifié d'après Ridker, 2002. Quelque soit le niveau de LDL, une CRP élevée suffit à diminuer la probabilité de survie sans événement cardiaque. De plus, une CRP élevée couplée à un niveau élevé de LDL diminue de manière importante cette probabilité.....	45
Figure 13 :	
Observation en microscopie électronique de microparticules circulantes de patients atteints de syndrome coronarien aigu. (D'après Drs Z. Mallat and M. Wassef, <i>Hypertension</i> , 2006).....	49
Figure 14 :	
Schéma d'une membrane cellulaire humaine vue en coupe transversale Adapté de Wiegmann B. et Gerfelmeyer H. <i>Membranen und osmose</i> , 2006.	50
Figure 15 :	
Schéma de la formation et de la libération des MPs (Piccin <i>et al.</i> , 2007).....	53
Figure 16:	
Structure prototypique des MPs : MPs cellulaires : un véritable pool de bioeffecteurs. (Hugel <i>et al.</i> , 2005).....	56
Figure 17 :	
Résultats obtenus illustrant la position des pré- β HDL après la migration et la coloration au rouge Soudan 7B du gel d'agarose (Titan Gel Lipoprotein Electrophoresis System Cat. No. 3045).....	63
Figure 18 :	
Détection des pré- β HDL sur gel avec Titan Gel Lipoprotein et par immunoblot avec l'anticorps anti-apoAI humaine.....	64
Figure 19 :	
Résultats des immunoblots obtenus avec des échantillons de plasmas de 3 patients, avec ou sans inhibiteurs, stockés pendant 3-4 heures et jusqu'à 7 à 8 heures.....	65
Figure 20 :	
Schéma de l'inter-conversion des HDL du système RCT. La conversion des pré β -HDL en α -HDL est promue par la LCAT, alors que la réaction inverse est favorisée par plusieurs facteurs, notamment la CETP, PLTP et HL. Le cycle RCT commence et se termine par la même particule, pré β 0-HDL.....	67
Figure 21 :	
Utilisation des billes Mégamix pour calibrer la zone de taille dans laquelle les microparticules sont quantifiées.	72
Figure 22 :	
Protocole de quantification et d'identification des MPs.	75
Figure 23 :	
Schéma du protocole de préparation du plasma pauvre en plaquettes (PPP).....	80

Figure 24 : Cytométrie de flux Les anticorps anti protéine A sont couplés à un fluorochrome dont l'émission fluorescente est détectée par le capteur. Adapté de Brown S., Fraasier V., ISV CNRS.....	82
Figure 25 : Protocole de marquage pour la détection des microparticules endothéliales.....	83
Figure 26 : Modèle utilisé pour la modélisation de la cinétique de l'apoB-100.....	91
Figure 27 : Modèle utilisé pour la modélisation de la cinétique de l'apoB-48.....	92
Figure 28 : Méthode d'analyse de la protéine CRP.....	94
Figure 29 : Résultats de la courbe des mesures d'enrichissement de la protéine CRP sur les échantillons avant perte de poids du patient E113.....	97
Figure 30 : Résultats de la courbe des mesures d'enrichissement de la protéine CRP sur les échantillons après perte de poids du patient E113.....	98
Figure 31 : Bilan des courbes d'enrichissement de la protéine CRP sur les échantillons avant et après perte de poids des 6 patients de l'étude.....	99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.

Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines...(adapté de Voet *et al.*, 2005 et Murray *et al.*, 2000).....4

Tableau 2 :

Caractéristiques cliniques et biochimiques, avant et après perte de poids, des 6 patients issus du recrutement pour cette étude.....96

METABOLISME DES LIPOPROTEINES ET BIOMARQUEURS DANS LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES

Mémoire d'Ingénieur CNAM, Lille, Janvier 2012

RESUME

METABOLISME DES LIPOPROTEINES ET BIOMARQUEURS DANS LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES

Malgré les nombreux progrès réalisés en recherche médicale, les maladies cardiovasculaires constituent l'une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés. La découverte de nouveaux biomarqueurs est un enjeu majeur pour l'industrie pharmaceutique. Le premier projet dans ce mémoire d'ingénieur concerne la mesure des concentrations de pré- β HDL. Celui-ci a clairement démontré que les pré- β HDL sont très instables dans le plasma et que leur concentration est tributaire de l'utilisation d'un inhibiteur des enzymes LCAT et LPL. La deuxième étude implique la mesure des microparticules circulantes par cytométrie en flux chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale subissant un traitement LDL-aphérèse. Les résultats ont montré que l'aphérèse peut diminuer la concentration de microparticules totales dans le plasma. Le troisième projet concerne la mesure de la cinétique de la protéine CRP en utilisant la spectrométrie de masse chez des volontaires obèses avant et après la perte de poids. Dans cette étude, j'ai montré qu'il est possible de mesurer le turnover de la CRP dans le plasma à l'aide d'isotopes stables et de la spectrométrie de masse, les résultats suggèrent que la perte de poids diminue le rendement hépatique de la CRP. Collectivement, ces résultats se sont révélés informatifs, des travaux supplémentaires sont nécessaires.

Mots-clés : maladies cardiovasculaires, biomarqueurs, athérosclérose, microparticules, pré- β HDL, CRP.

ABSTRACT

LIPOPROTEINS METABOLISM AND BIOMARKERS IN CARDIOVASCULAR DISEASES

Despite the huge progress made in medicine, cardiovascular diseases remain one of the greatest causes of death in the industrialized world. The discovery of novel biomarkers to evaluate treatment's efficacy at the preclinical and clinical levels is a major stake for the pharmaceutical industry. The first project in this engineering memory involves the measurement of pre- β HDL concentrations. This first study clearly demonstrated that pre- β HDL is highly unstable in plasma and that its concentration is dependent on using inhibitor of the enzymes LCAT and LPL. The second concerns the measurement of plasma microparticles using flow cytometry in patients with familial hypercholesterolemia undergoing apheresis. The results have shown that apheresis can decrease total microparticle concentrations in plasma. The third project involves the measurement of CRP kinetics using mass spectrometry in obese volunteers before and after weight loss. In this study, I demonstrated that it is possible to measure the turnover of CRP in plasma using stable isotopes and mass spectrometry; the results suggest that weight loss decreases the hepatic output of CRP. Collectively, these results have proved informative, further work is required.

Keywords: cardiovascular diseases, biomarkers, atherosclerosis, microparticles, pre- β HDL, CRP.