



HAL
open science

Activation inflammatoire des macrophages par les lipoprotéines riches en triglycérides dans le contexte de l'athérosclérose

Mélina Guillon

► **To cite this version:**

Mélina Guillon. Activation inflammatoire des macrophages par les lipoprotéines riches en triglycérides dans le contexte de l'athérosclérose. Sciences pharmaceutiques. 2024. dumas-04598222

HAL Id: dumas-04598222

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04598222>

Submitted on 3 Jun 2024

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA FACULTE DE
PHARMACIE DEMARSEILLE

LE 27 MAI 2024

PAR

MME Méline GUILLON

Née le 03 décembre 1995 à Saint-Raphaël

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

**Activation Inflammatoire des Macrophages par les Lipoprotéines Riches en
Triglycérides dans le contexte de l'Athérosclérose**

JURY :

Président : Dr Alain NICOLAY

Membres : Dr Cindy SERDJEBI, Pr. Aurélie LEROYER (Directrice de thèse)



Màj : 23.02.2023

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	M. Jean-Paul BORG
<i>Vice-Doyens :</i>	Mme Florence SABATIER-MALATERRE, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT, Mme Alexandrine BERTAUD
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, Mme Alexandrine BERTAUD, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, M. Philippe GARRIGUE, M. Guillaume HACHE, M. Thierry TERME
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE, Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Philippe CHARPIOT, M. Riad ELIAS
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Sylvie BUREAU
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Manon BONIFAY
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
--

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE
--

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC M. François DEVRED
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pierre REBOUILLON M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE	M. Jérémy MAGALON Mme Carole SIANI Mme Muriel MASI

ENSEIGNANT CDI

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN
---------	-----------------------

A.H.U.

PHARMACOTECHNIE	Mme Mélanie VELIER
-----------------	--------------------

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE
--

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN Mme Sandra GHAYAD
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Amandine BONIFAY
----------------------------	----------------------

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)
--

PRATIQUE OFFICINALE	M. Jérôme JOUVE Mme Emmanuelle TONNEAU-PFLUG
---------------------	---

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE Responsable : Professeur Patrice VANELLE
--

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	Mme Sok Siya BUN

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTO GAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL M. Quentin ALBERT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER M. Mathieu CERINO
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC M. Pascal PRINDERRE
CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Béatrice BAGHDIKIAN M. Elnur GARAYEV

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)
--

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	Mme Haïfa LAYACHI RAHABI M. Cyril PUJOL
DROIT ET ETHIQUE	Mme Laurie PAHUS
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA
DISPOSITIFS MEDICAUX	Mme Valerie MINETTI-GUIDONI

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE M. Joseph CICCOLINI
TOXICOLOGIE GENERALE	Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD Mme Marie-Anne ESTEVE
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET
PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	Mme Anaïs MOYON
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA Mme Anne RODALLEC M. Nicolas FABRESSE
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Pierre-Henri VILLARD

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	M. Vincent NAIL
PHARMACIE CLINIQUE	Mme Maeva MONTALEYTANG Mme Charlotte BERARD

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE
--

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Annie CILIA, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Yann COTTE, Pharmacien Assistant
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Mélanie FALZON, Pharmacie-Adjoint
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire
Mme Céline HIRSCH, Pharmacien Conseil de l'Assurance Maladie
Mme Christelle LABRANDE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Florence LEANDRO-DIJON, Pharmacien adjoint
Mme Nathalie MARTIN, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie MERLIN, Pharmacien Assistant
Mme Vanessa METZ, Pharmacien hospitalier
Mme Alice PERINEAU, Pharmacien Assistant
Mme Florence PEYRON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Bertrand POURROY, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier
M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 février 2023

REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse Mme Aurélie Leroyer pour son intérêt et son soutien, son expertise et son expérience, sa grande disponibilité et ses nombreux conseils durant la rédaction de ma thèse. Je remercie également Mme Cindy Serdjebi et Mr. Alain Nicolay qui ont accepté de faire partie de mon jury. Mme Serdjebi en particulier m'a motivée à compléter mes études de pharmacie avec une thèse de sciences, que je débute cet été. Les expériences hors du commun que j'ai pu vivre à l'étranger n'auraient pas été possible sans le soutien et l'aide de Mme Manon Bonifay. Merci encore de tout de mon cœur de m'avoir aidé à poursuivre mon rêve. Il est évident que ces années d'études furent une épreuve longue et éprouvante et au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont le plus chers, mes parents, mon frère et ma sœur. Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour ma meilleure amie, qui sait tout de moi et est toujours là pour me soutenir.

RÉSUMÉ

Contexte: L'inflammation est un facteur clé de la maladie cardiovasculaire athéroscléreuse (MCAS) et est présente à toutes les phases de la maladie. Il a été démontré que diminuer l'inflammation en bloquant les voies de signalisation des cytokines pro-inflammatoires diminue le risque d'accident vasculaire cérébral et d'infarctus du myocarde. En dépit du lien bien établi entre les lipoprotéines et l'athérosclérose, l'effet spécifique des lipides sur l'inflammation reste insuffisamment investigué. Dans cette étude, nous avons étudié spécifiquement l'impact des lipides des lipoprotéines riches en triglycérides (LRTs) sur l'inflammation, dans le contexte de l'athérosclérose.

Méthodes: Les LRTs ont été isolées et purifiées à partir d'un pool de plasma provenant de volontaires sains et des particules d'émulsion (PEs) ont été générées par sonication à partir de lipides extraits des LRTs. Les LRTs et les PEs ont été caractérisées en termes de taille, de triglycérides et de teneur en cholestérol. Les cellules macrophagiques THP-1 ont été traitées avec des PEs, des LRTs et des PEs modifiées par oxydation, vortexées et lipolysées avec la PLA2, et la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α) a été détectée grâce à la méthode ELISA.

Résultats: Les PEs ont été synthétisées avec succès par sonication à l'aide d'une sonde ultrasonique. Les PEs induisent la sécrétion de cytokines par les cellules macrophagiques THP-1 (n = 4). Les PEs modifiées (PE oxydées, PE vortexées et PE traitées à la PLA2) n'ont pas augmenté la sécrétion de cytokines par rapport aux cellules traitées avec des PE non modifiées (n = 4).

Conclusion: Nos résultats suggèrent que les lipides des LRTs contribuent à l'inflammation. De ce fait, les LRTs peuvent jouer un rôle crucial dans la pathogenèse et la physiopathologie de la MCAS. Les propriétés inflammatoires des LRTs devraient faire à l'avenir l'objet d'études approfondies dans le but de développer des stratégies préventives et curatives.

ABRÉVIATIONS

ApoB	apolipoprotéine B
AGL	acide gras libre
AGNE	acide gras non estérifié
BCA	acide bicinchoninique
CRP	protéine C-réactive
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
HDL	lipoprotéine de haute densité
IDL	lipoprotéine de densité intermédiaire
IFN- γ	interféron γ
IL	interleukine
KBr	bromure de potassium
LDL	lipoprotéine de basse densité
LPL	lipoprotéine lipase
Lp-PLA2	phospholipaseA2 associée aux lipoprotéines
LRT	lipoprotéine riche en triglycérides
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MCAS	maladie cardiovasculaire athéroscléreuse
MCV	maladie cardiovasculaire
MICI	maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family pyrin domain containing 3</i>
Ox	oxydé
PBS	solution saline tamponnée au phosphate
PCSK9	proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9
PE	particule d'émulsion
PLA2	phospholipase A2
RCH	rectocolite hémorragique
sPLA2	phospholipaseA2 sécrétoire
STEMI	angioplastie coronaire pour infarctus du myocarde avec élévation du segment ST
SVF	sérum de veau fœtal

TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TG	triglycéride
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- α	facteur de nécrose tumorale alpha
VLDL	lipoprotéine de très basse densité
Vx	vortexé

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Ce projet de recherche a été réalisé au sein du laboratoire du Pr. Katariina Öörni à l'Institut de Recherche Wihuri spécialisé en recherche vasculaire, durant le stage de master de science en neurosciences à l'université d'Helsinki, Finlande, couvrant la période de Octobre 2022 à Avril 2023.

L'objectif général de ce projet fut d'étudier l'impact des lipoprotéines riches en triglycérides (LRT) sur l'inflammation, dans le contexte de l'athérosclérose.

Plus précisément, les trois objectifs suivants furent fixés:

- Le développement d'une méthode de synthèse de particules d'émulsion (PE) générées à partir de LRT humains (Chylomicrons, VLDL, IDL).
- L'étude de la libération de marqueurs spécifiques de l'inflammation (IL-1 β et TNF- α) par les macrophages traités avec des LRT.
- L'évaluation de l'effet des lipides sur l'inflammation, plus particulièrement en traitant les macrophages avec des PE et des PE modifiées.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	5
RÉSUMÉ	9
ABRÉVIATIONS	10
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	12
1 INTRODUCTION	16
1.1 L'athérosclérose	16
1.2 Formation de la lésion athéroscléreuse	23
1.3 Les lipoprotéines	25
1.4 Les LRT sont les principaux transporteurs de triglycérides dans la circulation.	27
1.5 Inflammation et athérosclérose	29
2 MATÉRIELS ET MÉTHODES	34
2.1 Isolement et purification des LRT	34
2.2 Quantification des lipoprotéines	34
2.3 Synthèse de particules d'émulsion	34
2.3.1 Extraction des lipides	34
2.3.2 Émulsification par sonication	35
2.3.3 Extrusion	35
2.4 Caractérisation des LRT et des PE	36
2.4.1 Taille	36
2.4.2 Lipides: triglycérides et cholestérol	36
2.5 Culture cellulaire	36
2.6 Modifications des LRT et des PE	37
2.6.1 Modification 1: Lipolyse avec la phospholipase A2 (PLA2)	37
2.6.2 Modification 2: Oxydation	37
2.6.3 Modification 3 : Mélange au vortex	37
2.7 Traitements cellulaires	37
2.8 Viabilité cellulaire	38

	14
2.9 ELISA indirect	38
2.10 Analyse statistique	39
3 RÉSULTATS ET DISCUSSION	40
3.1 Synthèse des PE par sonication générées à partir de LRT humains	40
3.2 Caractérisation des lipides des LRT et des PE : concentration en cholestérol et triglycérides	44
3.3 Étude de la libération d'IL-1β et de TNF-α par des macrophages traités avec des LRT et des PE	44
3.3.1 Sécrétion d'IL-1 β par les cellules THP-1 traitées avec des PE ou avec des LRT	45
3.3.2 Sécrétion de TNF- α par les cellules THP-1 traitées avec des PE ou avec des LRT	45
3.4 Modifications des LRT et des PE	46
3.4.1 LRT et PE modifiées par lipolyse avec la PLA2	47
3.4.2 LRT et PE modifiées par oxydation	47
3.4.3 LRT et PE modifiées par vortex	48
4 CONCLUSION	58
5 RÉFÉRENCES	59

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - L'accumulation de lipides dans les artères coronaires peut aboutir à la formation de plaques d'athérome, ce qui réduit le calibre de l'artère affectée, et ultimement amène à la formation d'un thrombus. Sarah Henaux 2013 ¹	15
Figure 2 - La maladie cardiovasculaire athérosclérotique, Libby et al. 2019 ²	17
Figure 3 - Les facteurs de risque cardiovasculaires, Hôpitaux Universitaires de Genève, 2023.....	18
Figure 4 – Structure d'une lipoprotéine CL, VLDL, IDL et LDL.....	24
Figure 5 – Les différentes classes de lipoprotéines, Introduction to lipids and proteins Kenneth R. Feingold 2024 ³	26
Figure 6 - L'implication du métabolisme intracellulaire dans la régulation de la capacité des macrophages. Sujun Xiao et al. 2024 ⁴	29
Figure 7 - L'inflammasome NLRP3 joue un rôle important dans l'athérosclérose. Silvis et al. 2020 ⁵	31
Figure 8 - Les lipoprotéines riches en triglycérides s'accumulent dans la paroi artérielle et induisent de l'inflammation, ce qui contribue à l'apparition et à la progression de la maladie cardiovasculaire athéroscléreuse.	32
Figure 9 – Synthèse de particules d'émulsion par sonication à partir d'extrait lipidique de LRT	41
Figure 10 – Distribution granulométrique des lipoprotéines riches en triglycérides (LRT) et des particules d'émulsion (PE).....	42
Figure 11 – Sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α par les cellules THP-1 traitées avec des LRT et des PE.....	45
Figure 12 - Sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α par des cellules THP-1 traitées avec des PE non modifiées et des PE modifiées.	48

1 INTRODUCTION

1.1 L'athérosclérose

1.1.1 Définition

L'athérosclérose est la forme la plus courante de maladie cardiovasculaire et l'une des principales causes de maladie coronarienne malgré des améliorations majeures au niveau des traitements. En Occident, l'athérosclérose est la première cause de décès (OMS, 2020). Elle se caractérise par une accumulation de lipides dans les artères, une modification de ceux-ci et une inflammation de la paroi vasculaire¹⁻³.

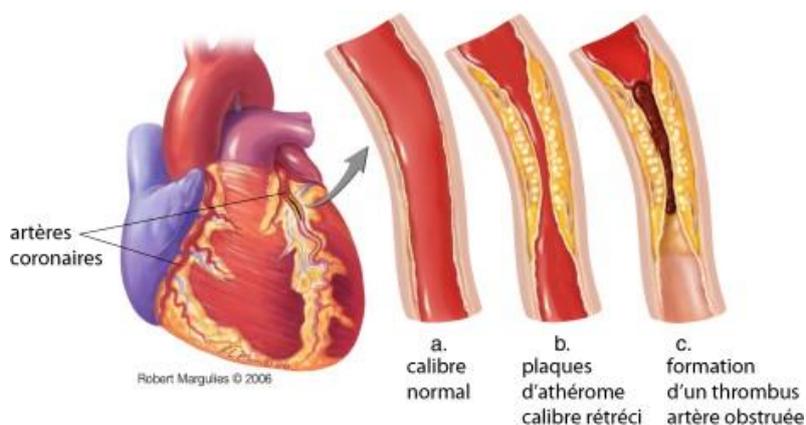


Figure 1 - L'accumulation de lipides dans les artères coronaires peut aboutir à la formation de plaques d'athérome, ce qui réduit le calibre de l'artère affectée, et ultimement amène à la formation d'un thrombus. Sarah Henaux 2013¹.

L'athérogenèse peut débuter dès l'enfance et évoluer progressivement au cours de la vie, où la formation de plaques lipidiques (athérome) sur la paroi interne des artères provoque leur épaissement et durcissement. Actuellement, l'athérosclérose touche de plus en plus la jeune génération par rapport aux décennies précédentes⁹. Après 40 ans, une personne d'apparence en bonne santé a un risque de développer la maladie de 50%, et le risque continue d'augmenter avec l'âge⁴. La détection précise et le traitement efficace des plaques instables restent difficiles, et l'intervention clinique habituelle consiste en une diminution des taux lipidiques sériques par des moyens diététiques et/ou médicamenteux, comme indiqué dans la directive ACC/AHA de

2018 qui met l'accent sur la réduction du risque de survenue de maladie cardiovasculaire par la gestion des lipides¹⁰.

De nombreux types de cellules immunitaires sont impliqués dans la pathogenèse de l'athérosclérose, les macrophages jouant un rôle central en tant que source principale d'effecteurs inflammatoires dans ce processus pathogène. Les influences métaboliques des lipides sur la fonction des macrophages et la β -oxydation des acides gras ont également attiré l'attention.

1.1.2 Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires affectent le cœur et les vaisseaux sanguins, notamment la maladie coronarienne ou coronaropathie, la maladie cérébrovasculaire et la maladie artérielle périphérique. Les maladies cérébrovasculaires font référence à un groupe d'affections qui affectent les vaisseaux sanguins et l'apport sanguin au cerveau. Ultimement, elles peuvent entraîner un accident vasculaire cérébral, généralement causé par l'athérosclérose où la plaque s'accumule dans les artères ou par les anévrismes qui éclatent. La coronaropathie se caractérise par l'accumulation de plaque d'athérosclérose dans les artères coronaires et sa principale conséquence clinique est un infarctus aigu du myocarde.

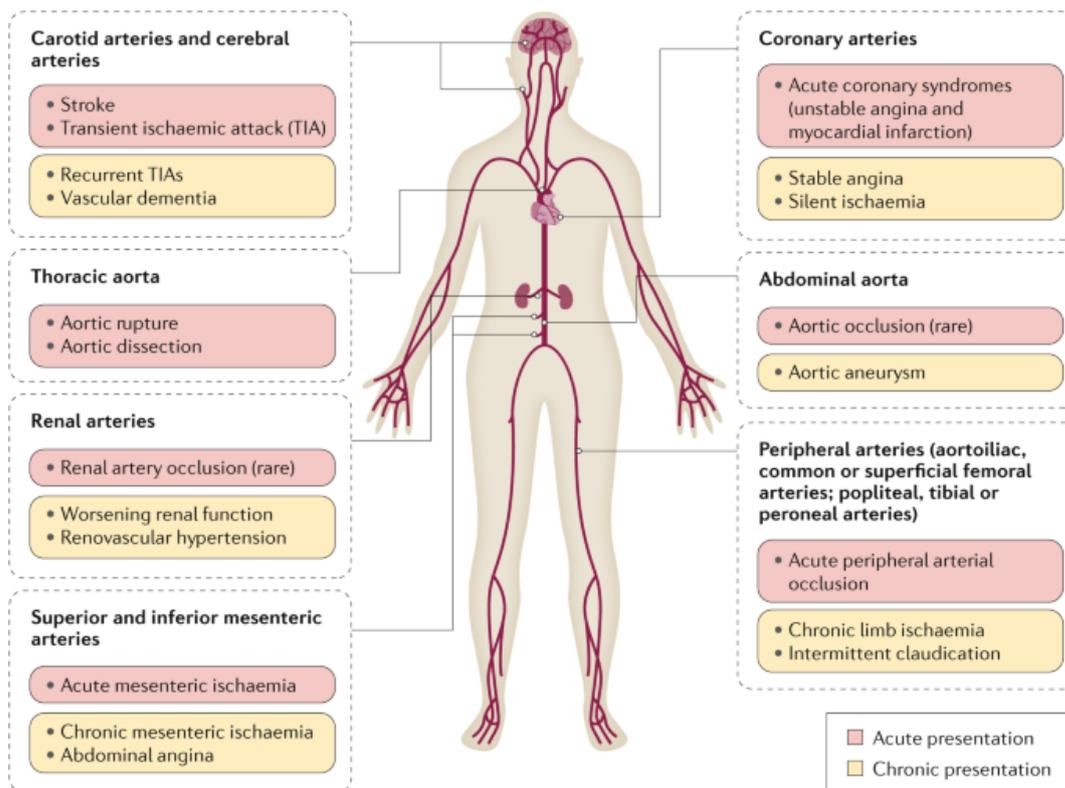


Figure 2 - La maladie cardiovasculaire athérosclérotique, Libby et al. 2019²

1.1.3 Les facteurs de risque pour le développement de l'athérosclérose

Contrôler les facteurs de risque qui conduisent à l'initiation et à la progression de la maladie cardiovasculaire athérosclérotique, tels que le tabagisme, l'inactivité physique, l'alimentation trop riche, l'hypertension artérielle et le diabète sucré, conduit à la réduction de la morbidité et de la mortalité liées à l'athérosclérose.

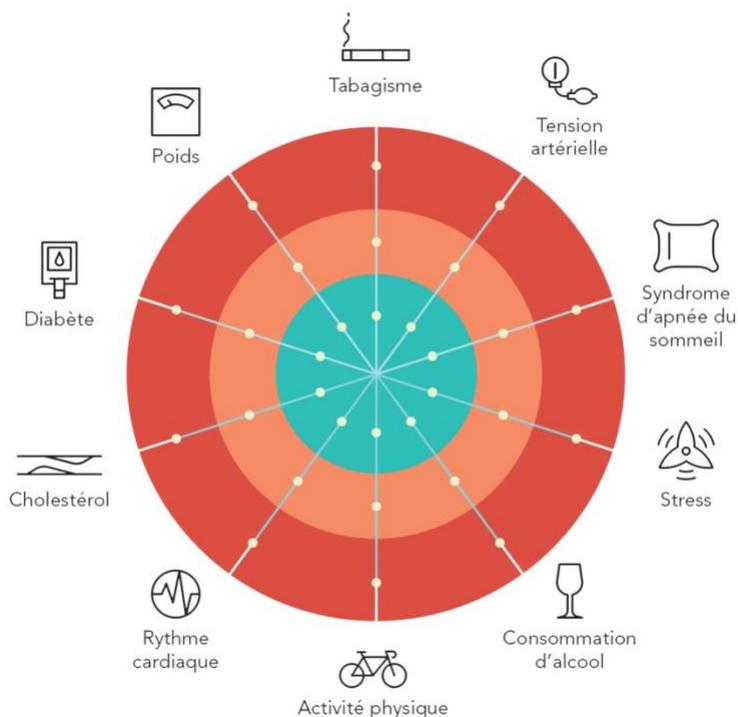


Figure 3 - Les facteurs de risque cardiovasculaires, Hôpitaux Universitaires de Genève, 2023

- L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (hypertension) est l'un des facteurs de risque les plus importants pour le développement de MCV. Si la tension artérielle est trop élevée, elle peut endommager les vaisseaux sanguins. La pression artérielle idéale est généralement considérée comme comprise entre 90/60 mmHg et 120/80 mmHg, tandis que l'objectif pour les personnes de plus de 80 ans est inférieur à 150/90 mmHg. L'hypertension artérielle persistante peut augmenter le risque de survenue d'un certain nombre de problèmes de santé graves et potentiellement mortels, tels que les maladies cardiaques, les crises cardiaques, les accidents vasculaires cérébraux, l'insuffisance cardiaque, les anévrismes de l'aorte, pour n'en nommer que quelques-uns.

- Le tabagisme

Le tabagisme constitue également un facteur de risque important. Les substances nocives contenues dans le tabac peuvent endommager la structure et altérer la fonction des vaisseaux sanguins.

- Des taux de cholestérol élevé

Le cholestérol est une substance grasse qui circule dans le sang. Des taux de cholestérol anormalement élevés peuvent favoriser un dépôt graisseux dans les vaisseaux sanguins,

pouvant engendrer leur rétrécissement et augmenter le risque de développer un caillot sanguin. Le médecin généraliste utilise le taux de cholestérol ainsi que d'autres facteurs, tels que l'âge, la tension artérielle et l'état de santé général du patient pour estimer le risque de développer une maladie cardiovasculaire. Un score QRISK qui estime la probabilité d'avoir un problème cardiaque ou circulatoire au cours des 10 prochaines années peut être calculé. Ce score permet d'orienter la prise en charge médicale vers un taux de cholestérol ciblé. Lorsqu'une personne présente un taux sanguin de cholestérol trop élevé sur deux analyses de sang consécutives, une prise en charge médicale peut en effet s'avérer nécessaire. Le médecin généraliste décide de l'opportunité du traitement en fonction de plusieurs paramètres : les taux sanguins de cholestérol total, LDL et HDL, le taux de triglycérides et l'existence de facteurs de risque cardiovasculaire (Vidal 2024).

- Le diabète

Le diabète correspond à un excès durable de la concentration de glucose dans le sang (hyperglycémie). Le taux normal de glycémie à jeun se situe entre 0,70 g et 1 g de glucose par litre de sang. En-dessous de 0,70 g/L, il s'agit d'hypoglycémie. Au-dessus d'1 g/L, on parle plutôt d'hyperglycémie. Le diabète se caractérise par un taux de glycémie supérieur à 1,26 g/L (Novo Nordisk, 2021). De nombreuses personnes atteintes de diabète de type 2 sont également en surpoids ou obèses, ce qui est aussi un facteur de risque pour le développement de MCV. Il existe 2 principaux types de diabète. Le diabète de type 1 est une maladie auto-immunitaire avec destruction des cellules β du pancréas, les cellules qui produisent l'insuline. Dans le diabète de type 2, la production d'insuline est insuffisante (insulopénie) et/ou les cellules du corps sont résistantes à l'action de l'insuline (insulinorésistance). Le diabète de type 2 est beaucoup plus fréquent que le diabète de type 1, et est provoqué par une perturbation du métabolisme glucidique. Si elle apparaît progressivement et insidieusement, la maladie a des conséquences très graves, voire mortelles, à long terme. En France, la prévalence globale du diabète était estimée à 5% de la population en 2016, le diabète de type 2 (DT2) correspondant à 90% des cas (Inserm, 2017). L'hyperglycémie qui se développe pendant la grossesse est nommée diabète gestationnel. Le plus souvent cette forme de diabète disparaît après l'accouchement. Enfin, de nombreuses personnes présentent une glycémie élevée mais cependant pas assez élevée pour être diagnostiquées comme diabétiques, on parle dans ce cas d'hyperglycémie non diabétique, ou prédiabète.

- L'inactivité

L'exercice est un pilier de la santé à côté du sommeil et de l'alimentation. Il réduit le risque de mortalité de manière générale. En particulier, faire de l'exercice est particulièrement bénéfique pour prévenir le risque de développer une maladie cardiovasculaire et neurodégénérative. Typiquement, une personne inactive peut souffrir d'hypertension artérielle, d'un taux de cholestérol élevé, d'une faible masse musculaire et peut être en surpoids. Faire de l'exercice régulièrement est particulièrement important pour le cœur et le système circulatoire, à tout âge.

- Le surpoids et l'obésité

L'obésité est un problème de santé publique mondial, dont l'incidence ne cesse d'augmenter. Selon l'OMS, depuis 1975, le nombre de cas d'obésité a presque triplé à l'échelle planétaire. L'obésité est associée à de nombreuses comorbidités et à une mortalité élevée. Cette maladie chronique inflammatoire complexe augmente ainsi le risque de maladies cardiovasculaires, de diabète, de troubles musculo-squelettiques, de nombreuses formes de cancers (de l'endomètre, du sein, des ovaires, de la prostate, du foie, de la vésicule biliaire, du rein et du colon...). Plus récemment, des données ont montré que les personnes en situation d'obésité étaient plus sujettes aux formes graves de Covid-19 (Inserm, 2023). Son impact sur la santé des populations et son coût économique et social sont donc considérables.

Le surpoids ou l'obésité augmente le risque de développer un diabète et une hypertension artérielle, qui sont tous deux des facteurs de risque de MCV. Le risque est accru dans le cas où l'indice de masse corporelle (IMC) est de 25 ou plus. L'IMC n'est pas toujours représentatif de la forme physique, il est donc important de mesurer son tour de taille. D'après Ameli, le surpoids concerne 47% des français adultes. Les hommes sont plus souvent en surpoids que les femmes (36,9% contre 23,9%) ; 17 % seraient obèses.

1.1.4 Les traitements

La prise en charge de la dyslipidémie fut la base de la prévention primaire et secondaire de la maladie athéroscléreuse, avec une réduction de 20 % du risque relatif d'événements cardiovasculaires majeurs par mmol/L de réduction du cholestérol des lipoprotéines de basse densité (LDL)¹¹. Cependant, malgré l'optimisation du mode de vie et les stratégies de traitement médical, des événements cardiovasculaires majeurs surviennent encore dans une proportion importante de la population. Ceci est communément décrit comme le « risque résiduel ».

Les traitements médicamenteux hypolipémiants sont indiqués pour la prévention primaire et secondaire des événements cardiovasculaires. La prévention primaire inclut les patients présentant des facteurs de risque mais sans antécédents d'événement cardiovasculaire. La prévention secondaire inclut les patients ayant des antécédents. Les agents hypolipémiants comprennent les statines (première intention), l'ézétimibe, les fibrates, l'acide nicotinique, le séquestrant des acides biliaires et les inhibiteurs de la PCSK9 (nouveau groupe de médicaments)¹⁰. Ces thérapies se sont avérées efficaces lorsqu'elles sont associées à des modifications du mode de vie et ceci pour la vie.

S'attaquer aux voies métaboliques et inflammatoires en tant que stratégies thérapeutiques dans les maladies cardiométaboliques est très prometteur. L'exemple le plus frappant de cette notion remonte peut-être à la découverte d'inhibiteurs spécifiques de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) réductase : les statines¹². Les statines représentent une pierre angulaire de la thérapie cardiovasculaire, un exemple dans lequel l'inhibition d'une voie métabolique a révolutionné la pratique clinique cardiovasculaire. Plus récemment, les effets bénéfiques du ciblage des voies inflammatoires pour traiter les maladies cardiométaboliques ont émergé avec les résultats de l'essai CANTOS (*Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome Study*) dans lequel le traitement anti-inflammatoire ciblant l'interleukine-1 β a conduit à un taux significativement plus faible d'événements cardiovasculaires récurrents par rapport au placebo, indépendamment du profil lipidique¹³.

Un tel risque résiduel de développer un événement cardiovasculaire peut refléter des aspects de l'athérogenèse, tels que des voies inflammatoires spécifiques, qui ne sont pas ciblées par les stratégies de traitement actuelles.

Bien que l'athérosclérose puisse se développer dans n'importe quelle artère, les artères carotides sont les plus touchées, suivies des artères périphériques et celles du cœur. Les artères coronaires sont un emplacement préférentiel pour l'initiation de la maladie, étant donné que les régions de bifurcation des branches sont des sites anatomiques préférentiels pour la formation des plaques¹⁴. De plus, la composition de la matrice extracellulaire de l'espace sous-endothélial au niveau des artères coronaires favorise le dépôt et la rétention des monocytes et des lipoprotéines. La courbure anatomique, l'épaisseur des vaisseaux, la qualité de la matrice

extracellulaire et le débit élevé font du cœur l'endroit prédominant pour l'accumulation de dépôts graisseux^{7,8}.

1.2 Formation de la lésion athéromateuse

L'athérogenèse est initiée lorsque des lipoprotéines circulantes contenant l'apolipoprotéine B (ApoB) pénètrent dans la paroi artérielle. Les lipoprotéines contenant l'Apo-B comprennent toutes les lipoprotéines à l'exception des lipoprotéines de haute densité (HDL). La paroi artérielle est composée de trois couches : la tunique externe ou adventitia, la tunique moyenne ou media, et la tunique interne ou intima. La tunique interne est composée de l'endothélium, de tissu conjonctif et d'une couche basale de tissu élastique également appelée lame élastique interne qui est située entre l'intima et la media¹⁷. L'endothélium est constitué d'une couche de cellules endothéliales sur le côté luminal du vaisseau sanguin et est en contact direct avec le sang. C'est également la partie la plus externe de l'intima.

Les cellules endothéliales sont connectées par des jonctions adhérentes (*adherens junctions*), serrées (*tight junctions*) et communicantes (*gap junctions*), formant une structure hautement dynamique et contrôlée, essentielle au maintien de l'homéostasie vasculaire. Des stimuli locaux et systémiques peuvent modifier la structure et la fonction de l'endothélium. Par exemple, de mauvaises habitudes alimentaires et du mode de vie affectent négativement son intégrité, résultant en son activation et une altération de sa perméabilité. En conséquence, les lipoprotéines circulantes peuvent entrer en contact avec le côté luminal des cellules endothéliales, traverser l'endothélium et s'infiltrer dans l'espace sous-endothélial où elles peuvent finir piégées, ce qui est favorisé par des concentrations anormalement élevées du taux de lipoprotéines plasmatiques, ainsi que par l'intégrité de l'endothélium comme il vient d'être dit. Les lipoprotéines contenant de l'ApoB en particulier pénètrent l'intima et peuvent interagir avec la matrice extracellulaire, spécifiquement avec les protéoglycanes, ce qui résulte en leur rétention et leur accumulation^{8,18,19}. De plus, la dysfonction endothéliale favorise le recrutement des cellules inflammatoires dans la paroi, telles que les monocytes qui se différencieront en macrophages.

Les lipoprotéines piégées sont modifiées in situ par des protéases, des lipases, des agents oxydants et des enzymes^{15,20,21}. Les macrophages résidents absorbent les lipoprotéines

modifiées par phagocytose ou via des récepteurs scavenger spécifiques (tels que CD36). Les macrophages résidents et l'endothélium endommagé libèrent des cytokines et des chimiokines, ce qui augmente l'inflammation locale et favorise le recrutement de monocytes circulants au site inflammatoire. C'est le point de départ de la formation de la lésion athéroscléreuse, c'est-à-dire l'accumulation d'une plaque lipidique dans un environnement hautement pro-inflammatoire, dans la paroi de l'artère.

L'inflammation et l'accumulation de lipides entraînent encore plus de modifications, à la manière d'un cercle vicieux. De plus, les lipoprotéines modifiées et agrégées présentent une affinité accrue pour les protéoglycanes, et leur absorption induit la conversion des macrophages en cellules remplies de lipides ou cellules spumeuses¹⁸ qui se trouvent être les principales cellules constituant des lésions précoces riches en macrophages (c'est-à-dire les stries lipidiques)²². Les macrophages apoptotiques et les corps apoptotiques sont efficacement éliminés par l'efférocytose, empêchant la formation et l'accumulation de corps nécrotiques et entraînant une réponse non inflammatoire. Cependant, au fur et à mesure que la maladie progresse, l'accumulation continue de lipoprotéines modifiées augmente l'apoptose des macrophages, ce qui entraîne le dysfonctionnement des mécanismes d'efférocytose et d'autophagie, processus essentiels de recyclages cellulaires normalement régulés. Dans les lésions avancées, l'efférocytose défectueuse entraîne une nécrose des macrophages apoptotiques non éliminés ainsi qu'une inflammation non résolue²³⁻²⁵.

La mort cellulaire est à l'origine de la formation du noyau nécrotique. Bien que l'apoptose ait été largement étudiée dans le contexte de l'athérosclérose, des découvertes récentes soulignent l'importance d'autres types de mort cellulaire, notamment la pyroptose²⁶ et la nécroptose^{19,20,21}. La nécroptose est un type de nécrose cellulaire programmée qui implique l'activation des récepteurs de mort par des ligands. Il a été récemment identifié comme l'un des principaux contributeurs à la formation du noyau nécrotique^{19,20,21}. La formation d'un noyau nécrotique exacerbe l'inflammation, maintient la progression de la lésion et influence la stabilité de la plaque.

L'architecture de la plaque est telle qu'un noyau nécrotique riche en lipides est recouvert d'une chape fibreuse. Finalement, la croissance du noyau provoque le rétrécissement de la lumière artérielle au point où le flux sanguin en devient altéré. La stabilité de la plaque dépend notamment de l'épaisseur de la chape fibreuse. Une chape fibreuse mince est sujette à la rupture.

La rupture de la plaque est l'élément qui compromet le pronostic vital du patient car il expose le contenu de la plaque hautement pro-coagulant à la circulation, ce qui génère un thrombus qui peut atteindre une artère coronaire, où il peut obstruer complètement la circulation sanguine, provoquant un infarctus du myocarde. Aussi, le thrombus peut disséminer dans la circulation et atteindre, par exemple, le cerveau où il pourrait provoquer un accident vasculaire cérébral⁸.

1.3 Les lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des complexes sphériques constitués de protéines et de lipides qui transportent les lipides alimentaires et lipides endogènes dans la circulation. Leur objectif principal est de fournir des lipides aux tissus périphériques pour la production d'énergie et pour répondre aux besoins cellulaires en cholestérol. Après un repas, les triglycérides alimentaires (TG) sont hydrolysés en glycérol et en acides gras (AG) dans l'intestin grêle, pour être convertis à nouveau en TG dans l'entérocyte et assemblés pour former des chylomicrons. Les chylomicrons sont les lipoprotéines les plus grandes (75 à 600 nm) et les moins denses³⁰. Ils quittent l'intestin grêle et entrent dans la circulation sanguine par les vaisseaux lymphatiques, pour délivrer des TG exogènes aux tissus périphériques. Dans la circulation, les chylomicrons sont métabolisés en remnants de chylomicrons, puis se dirigent vers le foie où ils contribuent à la synthèse des lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Les VLDL sont générées en permanence par le foie pour transporter les triglycérides endogènes dans la circulation, et sont plus petits que les chylomicrons, avec un diamètre moyen de 30 à 90 nm³¹.

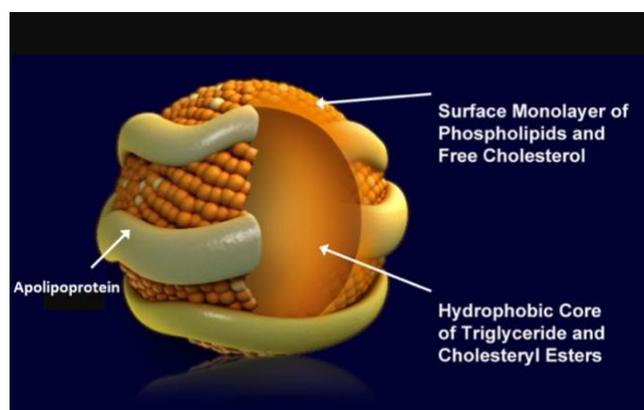


Figure 4 – Structure d'une lipoprotéine CL, VLDL, IDL ou LDL, Introduction to lipids and proteins Kenneth R. Feingold 2024³

La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme clé dans le métabolisme des TG. La LPL se trouve à la surface des cellules endothéliales, du côté luminal du vaisseau, et remodèle le cœur des chylomicrons en convertissant un TG en monoacylglycérol et deux AG. Elle est exprimée dans le cœur, les muscles et le tissu adipeux, mais pas dans le foie. Les AG libérés peuvent être transférés aux cellules cardiaques ou squelettiques qui se trouvent à proximité pour produire de l'adénosine triphosphate (ATP), ou stockés dans le tissu adipeux³². Les chylomicrons et les VLDL sont métabolisés par la LPL dans la circulation et leur conversion progressive produit des remnants de plus en plus petits et de plus en plus denses.

La transformation des VLDL conduit à la formation de lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) et de lipoprotéines de basse densité (LDL), qui sont très petites et denses, contenant principalement du cholestérol estérifié en leur centre. Les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont sécrétées à la fois par l'intestin et le foie et sont récupérées par le foie. Le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie est qualifié de transport inverse du cholestérol (ou RCT). Les HDL subissent également des transformations dans la circulation³³.

Les lipoprotéines contenant de l'apoB sont athérogènes et associées à un risque accru de MCV. Les particules de LDL sont le principal vecteur de cholestérol chez l'homme et leur rôle dans la MCAS est généralement bien établi. En effet, des recherches approfondies ont montré que le cholestérol LDL en est un facteur de risque causal et modifiable^{26,27}. La particule LDL est considérée comme la plus nocive car c'est la lipoprotéine la plus représentée dans le sang à jeun, et elle a une demi-vie longue par rapport aux autres lipoprotéines contenant l'ApoB.

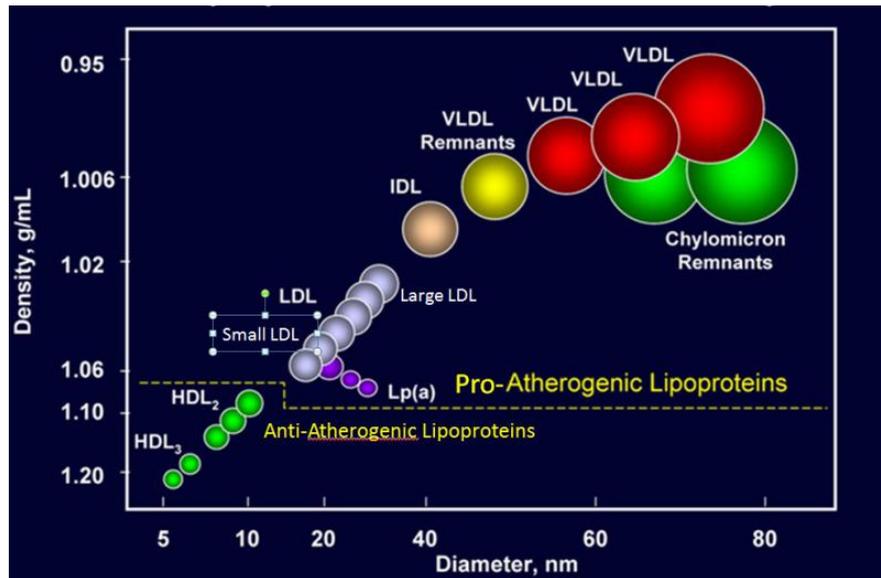


Figure 5 – Les différentes classes de lipoprotéines, Introduction to lipids and proteins

Kenneth R. Feingold 2024³

1.4 Les LRT sont les principaux transporteurs de triglycérides dans la circulation.

En plus des LDL, il est de plus en plus reconnu que les lipoprotéines riches en triglycérides (LRTs) contribuent à l'athérosclérose³⁶. Les LRTs forment une classe hétérogène de lipoprotéines et sont définies en fonction de leur taille, de leur densité, et de manière encore plus spécifique, de leur protéome. Les LRTs sont les chylomicrons, VLDL, IDL et leurs remnants, c'est-à-dire toutes les lipoprotéines à l'exception des LDL et des HDL.

Les triglycérides sont l'association de trois acides gras avec une molécule d'acyl glycérol, stockés principalement dans le tissu adipeux, ou transportés dans la circulation par les LRTs. Les LRTs sont riches en triglycérides par rapport aux LDL et aux HDL.

Alors que les chylomicrons sont produits après un repas, les VLDL sont également sécrétés pendant le jeûne, mais l'organisme étant dans un état postprandial la plupart du temps, une quantité relativement élevée de LRT circule constamment dans le corps. L'habitude de grignoter provoque certainement une augmentation constante des niveaux de chylomicrons et

de VLDL. Les TRL, y compris les remnants de chylomicrons, peuvent pénétrer dans l'intima et être absorbés par les macrophages vasculaires.³⁷

L'obésité et la résistance à l'insuline sont aujourd'hui très courantes comme indiqué précédemment. En cas d'obésité, les niveaux d'acides gras non estérifiés circulants (AGNE), également appelés acides gras libres (AGL), sont augmentés^{38,39}. Chez les patients souffrant d'obésité et en particulier de résistance à l'insuline, les VLDL sont sur-sécrétés et éliminés plus lentement que chez les personnes sensibles à l'insuline. De plus, une lipolyse inefficace des LRTs observée dans l'obésité et le syndrome métabolique augmente leur durée de circulation⁴⁰.

Considérer un taux élevé de TG circulants comme facteur causal de MCAS est controversé mais des études épidémiologiques et génétiques ont montré que les TG et LRT entraînent un risque supplémentaire de MCAS défini par le terme "risque cardiovasculaire résiduel"^{33,34,35}. Des taux sériques élevés de TG augmentent le risque cardiovasculaire lorsque d'autres facteurs comme le LDL-C sont contrôlés de manière optimale, et l'association d'un taux élevé de LDL-C et de TG constitue un risque particulièrement élevé de développer une maladie coronarienne⁴⁴.

À ce jour, les mécanismes liés à l'accumulation de lipides et à l'inflammation induites par les LRT ne sont pas clairs. Le rôle potentiel des constituants lipidiques des TRL est particulièrement intéressant. Plusieurs modèles d'étude renforcent l'hypothèse selon laquelle les LRT sont un facteur de risque causal de l'athérosclérose en raison de leur action pro-inflammatoire⁴⁵. Comme les LRT sont de grande taille, ils transportent beaucoup de cholestérol, appelé cholestérol résiduel, qui est lui-même un facteur de risque pour l'initiation et la progression de la MCAS. De plus, les LRT transportent beaucoup de TG, et même si l'athérome est composé de cholestérol, la lipolyse des remnants piégés peut contribuer fortement à l'inflammation. En effet, les AGNE sont toxiques pour la cellule et induisent la production de médiateurs inflammatoires⁴⁶⁻⁴⁸. L'une des principales caractéristiques des LRTs est qu'ils n'ont pas besoin d'être préalablement modifiés pour être absorbés par les macrophages, contrairement aux LDL^{22,45}. Dans l'ensemble, ces résultats signifient que les LRT ou remnants peuvent contribuer grandement à l'inflammation.

1.5 Inflammation et athérosclérose

En 1999, Russell Ross a proposé le concept d'athérosclérose en tant que réaction inflammatoire chronique après avoir observé une infiltration de monocytes circulants dans une strie lipidique⁴⁹. L'inflammation est un facteur clé de l'athérosclérose et est présente à toutes les phases. Les plaques inflammatoires sont particulièrement instables³.

Les monocytes sont recrutés sur le site inflammatoire pour l'élimination des lipides et des lipoprotéines modifiées, attirés par les cytokines et les chimiokines libérées par l'endothélium endommagé et par les cellules intimes telles que les macrophages. Au site de la lésion, les monocytes se différencient en macrophages aux propriétés pro-inflammatoires au sein de l'intima artérielle, amplifiant ainsi localement la réponse inflammatoire.

Les macrophages sont des cellules immunitaires innées spécialisées dans la détection, la phagocytose et la neutralisation d'agents pathogènes nocifs. L'impact des macrophages sur le développement de l'athérosclérose est étroitement associé à leur polarisation et aux phénotypes qui en résultent. Généralement, les macrophages sont classés soit comme le phénotype M1 activé classiquement et ayant des propriétés pro-inflammatoires, soit comme le phénotype M2 anti-inflammatoire. Alors que les macrophages M1 sont activés par l'interféron γ (IFN- γ), l'interleukine-1 β (IL-1 β) et les lipopolysaccharides (LPS), les macrophages M2 sont induits par l'IL-4 et l'IL-13. Récemment, la pertinence du métabolisme intracellulaire dans la gouvernance de la fonctionnalité des macrophages a attiré une attention particulière. Alors que la glycolyse est considérée comme jouant un rôle crucial dans l'activation des macrophages M1, l'oxydation des acides gras est considérée comme nécessaire à l'activation des macrophages M2.

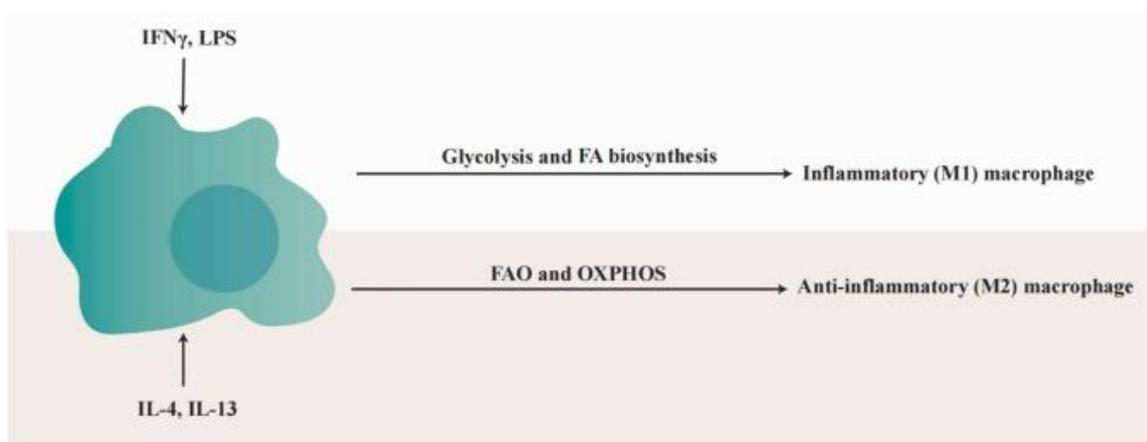


Figure 6 - L'implication du métabolisme intracellulaire dans la régulation de la capacité des macrophages. Sujun Xiao et al. 2024⁴

Les macrophages peuvent sécréter des cytokines qui régulent l'inflammation. Les macrophages peuvent absorber les lipides et les stocker dans des gouttelettes lipidiques. Il est établi que l'absorption des LDL est médiée par un groupe de récepteurs scavengers structurellement non apparentés⁴¹, également appelés récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR pour *pattern recognition receptor*), après qu'ils aient été oxydés⁵¹.

On sait peu de choses sur la façon dont les macrophages absorbent et transforment les LRT. Contrairement aux LDL, les LRT natifs (non modifiés) peuvent être absorbés par les macrophages. Il a été récemment étudié et démontré que leur absorption dépend de la LPL⁵², et leur internalisation par les macrophages est réalisée par l'endocytose cavéole-dépendante. Il a également été démontré que les TG sont hydrolysés dans le lysosome et excrétés sous forme d'AG⁵³. On ne sait pas grand-chose d'autre.

L'effet des LRT natifs et modifiés sur l'inflammation n'est pas clair. Cependant, on sait que la LPL est exprimée dans les cellules spumeuses et dans les macrophages au niveau de l'athérome⁴⁵. Plus important encore, l'expression de la LPL dans les macrophages peut favoriser la formation de cellules spumeuses à partir des LRT⁵⁴.

Des quatre stades de la physiopathologie de l'athérosclérose, comprenant le dysfonctionnement endothélial suivi d'un dépôt de lipoprotéines, la formation de cellules spumeuses, la

prolifération et la migration des cellules inflammatoires, la réponse inflammatoire semble avoir le rôle le plus important. Elle est impliquée à la fois dans l'initiation et la progression de l'athérogenèse. Après que la dyslipidémie soit apparue comme un facteur de risque majeur d'athérosclérose pouvant conduire à des MCV, d'autres recherches ont prouvé que les événements cardiovasculaires liés à l'athérosclérose ne dépendent pas entièrement des taux de lipides plasmatiques, ce qui a entraîné l'émergence de facteurs de risque supplémentaires sous-jacents au développement de l'athérosclérose. Depuis les premiers rapports sur la théorie inflammatoire de l'athérosclérose en 1999⁴⁹ jusqu'à aujourd'hui, la recherche est axée sur l'inflammation systémique considérée comme facteur de risque basé sur la relation bien établie entre l'augmentation des événements CV et les marqueurs pro-inflammatoires, tels que IL-6 et la protéine C-réactive à haute sensibilité (hsCRP).

Les macrophages activés produisent principalement des cytokines pro-inflammatoires. Les remnants de VLDL modifiées par la LPL présentent une expression accrue de TNF- α et d'IL-1 β par rapport aux VLDL natifs⁵⁵. Le TNF- α et l'IL-1 β sont des molécules pro-inflammatoires et des marqueurs d'activation cellulaire qui sont associés à l'athérosclérose^{56,57}. La réduction de l'inflammation au niveau de la lésion athéroscléreuse peut offrir des possibilités d'intervention clinique dans la prévention et le traitement de l'ASCVD, comme l'a montré l'essai clinique CANTOS (Novartis, 2011-2019)¹³. Il est intéressant de noter que la susceptibilité à l'agrégation des LDL, augmentée par des modifications, est liée à de futurs accidents cardiovasculaires chez les patients atteints d'athérosclérose^{58,59}.

Compte tenu de la complexité physiopathologique et des modèles épigénétiques de l'athérosclérose et de la découverte de nouvelles molécules impliquées, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques de l'athérosclérose fait l'objet de nombreuses études. Ainsi, la communauté scientifique étudie actuellement le rôle de l'inflammasome de la famille des récepteurs de la famille des domaines de la pyrine contenant 3 (NLRP3), un composant crucial du système immunitaire inné dans différents troubles inflammatoires. NLRP3 est activé par des facteurs distincts et de nombreux événements cellulaires et moléculaires qui déclenchent l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 avec le clivage ultérieur des voies pro-interleukine (IL)-1 β et pro-IL-18 via l'activation de la caspase-1, provoquant un dysfonctionnement endothélial, la promotion du stress oxydatif et le processus inflammatoire de l'athérosclérose.

Un nombre grandissant de preuves voit le jour selon lesquelles les modèles moléculaires associés aux dommages (DAMP), l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie sont associés à l'apparition accélérée de l'athérosclérose via l'inflammasome NLRP3. Il a également été établi que l'inflammasome NLRP3 associé à l'activation de l'IL-1 β et de l'IL-18 amplifie les lésions des cellules endothéliales vasculaires, l'adhésion et l'infiltration des monocytes, la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et favorise la vulnérabilité de la plaque⁹.

Le rôle de l'inflammation dans l'athérosclérose est actuellement largement exploré et ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques dans l'athérosclérose, notamment pour contrôler le risque résiduel⁹.

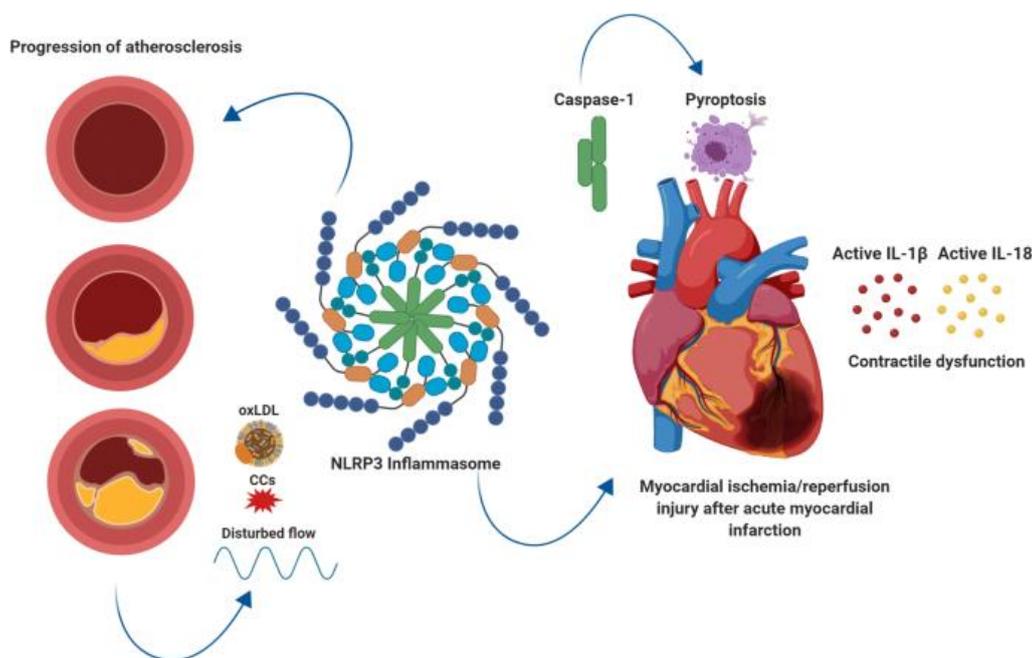


Figure 7 - L'inflammasome NLRP3 joue un rôle important dans l'athérosclérose. Silvis et al. 2020⁵.

Les lipoprotéines piégées dans l'intima subissent des modifications par une variété d'agents oxydants et d'enzymes. Les cellules locales sécrètent des protéases et des lipases qui modifient la structure des lipoprotéines en induisant leur agrégation, fusion et rétention dans la paroi artérielle^{8,18,21,60}. Les lipoprotéines modifiées contribuent grandement à l'inflammation de la paroi artérielle au cours de l'athérogenèse²². Les lésions athéroscléreuses contiennent des LDL

modifiés qui présentent des signes avancés d'oxydation, lipolyse et de protéolyse et ces LDL sont souvent agrégés²⁰.

On en sait très peu sur l'importance des modifications des LRT dans le développement et la progression de la MCAS. Plus précisément, leurs effets pro-inflammatoires peuvent être particulièrement pertinents dans le contexte de l'apparition et de la progression progressive de la maladie.

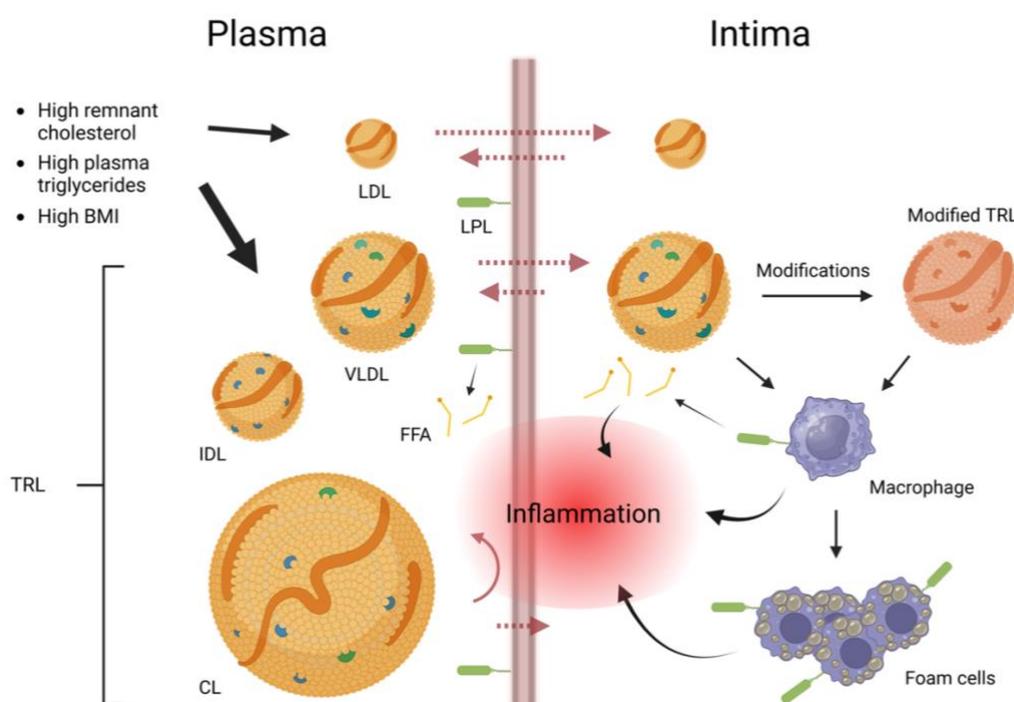


Figure 8 - Les lipoprotéines riches en triglycérides s'accumulent dans la paroi artérielle et induisent de l'inflammation, ce qui contribue à l'apparition et à la progression de la maladie cardiovasculaire athéroscléreuse. BMI indique l'indice de masse corporelle (*body mass index*) ; CL, chylomicron ; FFA, acide gras libre (*free fatty acid*) ; IDL, lipoprotéine de densité intermédiaire (*intermediate-density lipoprotein*) ; LPL, lipase lipoprotéine ; LDL, lipoprotéines de basse densité (*low-density lipoprotein*) ; TRL, lipoprotéine riche en triglycérides (*triglycerid-rich lipoprotein*) ; et VLDL, lipoprotéine de très basse densité (*very low-density lipoprotein*). Créé avec BioRender.com, adapté de Nordestgaard (2016)⁴⁵.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Isolement et purification des LRT

Les chylomicrons humains, les VLDL ($d = \leq 1,006$ g/mL) et les IDL ($d = 1,006-1,019$ g/mL) ont été isolés à partir de plasma poolé de volontaires sains provenant du service du sang de la Croix-Rouge finlandaise, Helsinki, Finlande) par ultracentrifugation à densité de flottaison⁵⁰ (rotor à angle fixe de type 50,2 Ti, 50 000 tr/min, 302 000 x g, 12 x 39 mL, Beckman Coulter Optima L-70, USA) pendant 22 h, à une vitesse de 40 000 tr/min et à 4 °C en présence de 3 mmol/L d'EDTA^{61,62}, 100 ug/mL de Gentamicine et de KBr. Après l'isolement, les LRT ont été dialysés à l'aide d'une membrane semi-perméable (12-14 kDa) et de grands volumes de PBS de basse température ont été fréquemment modifiés, pour être en accord avec la loi de diffusion de Fick. Les LRT ont ensuite été concentrées par centrifugation (80 min, 2700 x g, 8 °C) dans des unités de filtration centrifuges (Amicon® Ultra-15, Sigma-Aldrich, Allemagne) et purifiées par filtration stérile (filtre seringue Minisart® 0,22 µm, Sartorius Stedim).

2.2 Quantification des lipoprotéines

Les quantités de LRT ont été exprimées en termes de concentrations en protéines, déterminées par la méthode de Lowry et al. à l'aide du kit de dosage des protéines Pierce™ BCA (Thermo Fisher Scientific, États-Unis).

2.3 Synthèse de particules d'émulsion

Dans un premier temps, des lipides ont été extraits des LRT isolées, séchés et remis en suspension dans le solvant approprié. Dans un second temps, des particules d'émulsion (PE) ont été synthétisées par sonication.

2.3.1 *Extraction des lipides*

Les lipides ont été extraits dans des tubes KIMAX (DWK Life Sciences, USA) à partir de LRT isolées à l'aide du procédé d'extraction de Folch mis au point en 1957 et toujours utilisé⁶³. Le système de solvant traditionnel est biphasique avec un rapport 2 :1 Chloroforme/Méthanol (v/v). Nous avons utilisé un système de solvant légèrement différent, composé d'un mélange de

chloroforme/méthanol/0,88% de KCl dans de l'eau et dans un rapport volumétrique de 8 :4 :3 (v/v/v). Les lipides ont été extraits à partir de 13 mL de LRTs. Pour 1000 µL d'échantillon, 1250 µL de chloroforme et 1250 µL de méthanol ont été ajoutés, vortexés, gardés dans de la glace pendant 15 minutes et centrifugés pendant 5 minutes à une vitesse de 1700 x g, à température ambiante. Le surnageant a été recueilli dans un tube KIMAX propre. Ensuite, 1250 µL de chloroforme et 1250 µL de KCl dilué à 0,88% dans de l'eau ont été ajoutés, vortexés et centrifugés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Sous la phase aqueuse se trouve la phase organique contenant les lipides. La phase organique est recueillie à l'aide d'une pipette Pasteur en verre sans perturber l'interface biphasique. La phase lipidique recueillie a été séchée à l'aide d'azote gazeux. L'utilisation de gaz inertes tels que l'azote protège les composés lipidiques de l'oxydation. Enfin, les lipides purs séchés ont été reconstitués dans 13 mL de PBS (+/+) (reconstitution en 1 mL pour 1 mL d'échantillon à extraire). La verrerie a été lavée méticuleusement avec de l'éthanol 1 :1 d'abord, du méthanol ensuite, et enfin soniquée à l'aide d'un bain à ultrasons.

2.3.2 *Émulsification par sonication*

Les PE ont été créés à partir d'extraits lipidiques purs remis en suspension dans du PBS (+/+) à l'aide d'une sonde à ultrasons (sonificateur Branson 250). Les lipides (13 mL) ont été soniqués dans un tube d'Eppendorf de 50 mL pendant 6 cycles de sonication continue de 5 min (contrôle de sortie 3, facteur de marche de 40 %). Pendant les rondes de sonication, le tube a été maintenu dans un bain d'eau pure et stérile chauffé à 40 °C. La durée totale de sonication fut de 30 min. Entre chaque tour, l'échantillon a été retiré du bain-marie pour faire descendre sa température, pendant environ 3 min, ou mis sur de la glace si la température dépassait 60 °C environ. Après sonication, les PE synthétisées ont été concentrées par centrifugation pendant 80 min, à 2700 x g et à 8 °C, permettant l'obtention de 2mL de PE concentrées.

2.3.3 *Extrusion*

Le Mini-Extruder (Avanti(R) Polar lipids, USA) pour la préparation des liposomes a été utilisé comme première tentative de création de PE. Les lipides remis en suspension ont été réchauffés dans un bain-marie pendant 30 min avant l'utilisation de l'extrudeuse. Le bloc chauffant a été réglé à plusieurs températures différentes, car la température optimale pour la synthèse des EP était inconnue. L'une des deux seringues était chargée avec les lipides extraits. L'autre seringue vide était insérée de l'autre côté de l'extrudeuse. L'échantillon a été passé à travers la membrane

5 fois minimum. Au fur et à mesure que les particules se formaient, l'échantillon devenait de plus en plus limpide.

2.4 Caractérisation des LRT et des PE

2.4.1 Taille

La taille des nanoparticules (LRT, LRT modifiées, PE et PE modifiées) a été mesurée à l'aide de l'instrument « Zetasizer Nano » (Malvern(R) Instruments, UK) qui permet de déterminer la taille des particules par spectrométrie de corrélation de photons, également appelée diffusion dynamique de la lumière. Des cuvettes en polystyrène à usage unique ont été remplies de 40 μL d'échantillon. L'appareil a effectué 3 mesures répétées à 20 °C.

2.4.2 Lipides: triglycérides et cholestérol

La détermination quantitative des lipides a consisté en la mesure de la teneur en cholestérol et en triglycérides et a été réalisée à l'aide de kits disponibles dans le commerce de Thermo Scientific (Vantaa, Finlande, 981812 de référence et 981301, respectivement). L'étalon utilisé pour le dosage du cholestérol était le calibreur de cholestérol HDL/LDL 4,835 mmol/L (référence DZ130A-S1V) des laboratoires Diazyme. L'étalon utilisé pour le dosage TG était le calibreur de glycérol Precimat 2,29 mmol/L ou 21 mg/dL (référence 10166588 lot 694 996-01) de Roche.

2.5 Culture cellulaire

Les cellules THP-1 ont été cultivées sous forme de monocytes, état dans lequel ils étaient en suspension (cellules non adhérentes), dans des flasques de culture cellulaire T75. Les cellules ont été mises en culture à une densité de 300 000 cellules/mL et jusqu'à 800 000 à 1 million de cellules/mL. La moitié du milieu de culture a été changée toutes les 48 heures, et seulement une fois par semaine, les cellules ont été centrifugées, l'ancien milieu retiré et remplacé par un nouveau milieu de croissance. Les cellules ont été maintenues dans un milieu de croissance RPMI complété par du FBS (10 %), 100 U/mL de pénicilline, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine, 2 mM de Glutamax (L-Glut) et 25 mM de HEPES dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO_2 à 37 °C.

2.6 Modifications des LRT et des PE

2.6.1 Modification 1: Lipolyse avec la phospholipase A2 (PLA2)

935 μ L de TRL (1 mg/mL de protéines, 2,56 mmol/L de TG, 1,17 mmol/L de cholestérol) et de 935 μ L de PE (2,52 mmol/L de TG, 0,59 mmol/L de cholestérol) ont été incubés à 37 °C pendant 30 min avec 25 μ L de billes activées par le NHS (*N*-hydroxysuccinimide) couplées au PLA2 stockées dans du PBS +/+, en présence de 0,04 % d'albumine sérique bovine sans acide gras. Le mélange réactionnel tournait à un rythme très lent pendant l'incubation. Les échantillons ont ensuite été centrifugés et les surnageants ont été collectés et filtrés de manière aseptique. Le degré de lipolyse induit par la modification avec la phospholipase A2 (PLA2) a été déterminé en mesurant la libération d'acides gras à l'aide du kit de dosage AGNE (Diagnostic Systems ref 1 5780 99 10 065 kit lot 60140159).

2.6.2 Modification 2: Oxydation

Les LRT (1 mg/L de protéines, 2,56 mmol/L de TG, 1,17 mmol/L de cholestérol) et PE (2,52 mmol/L de TG, 0,59 mmol/L de cholestérol) ont été oxydées par addition de sulfate de cuivre (5 μ M) à 37 °C⁶⁴. L'oxydation a été terminée par l'ajout d'EDTA (50 μ M). Le dosage de la substance réactive de l'acide thiobarbiturique (TBARS) a été utilisé pour mesurer la peroxydation lipidique. Ce contrôle qualité détecte le niveau de malondialdéhyde (MDA), le principal produit d'oxydation des lipides, ainsi que certains composés mineurs apparentés.

2.6.3 Modification 3 : Mélange au vortex

Les LRT ont été mélangé au vortex à pleine vitesse pendant 30 secondes.

2.7 Traitements cellulaires

Les expériences *in vitro* ont été réalisées sur des cellules THP-1 différenciées en macrophages. Les cellules THP-1 à l'état monocytaire ont étéensemencées à 300 000 cellules par mL dans des plaques de 24 puits en duplicata. La différenciation du monocyte au macrophage a été induite par l'ajout de 100 nM de phorbol 12-myristate-13-acétate (PMA) (Calbiochem cat n° 524400-1MG, Billerica, MA USA) au milieu de croissance pendant 48 h, suivi d'un jour de repos dans un milieu de culture frais pendant 24 h (temps total de différenciation 72 h). Les

macrophages ont été incubés à 37 °C avec un traitement pendant 3h ou 18h. Ensuite, les cellules et les surnageants ont été prélevés séparément à des fins d'analyse.

Des traitements d'un volume de 50 µL ont été préparés dans du PBS (+/+) et ajoutés à un milieu de culture sans sérum pour un volume total par puits de 500 µL. Les cellules ont donc été placées dans un milieu de culture sans sérum (contrôle négatif) [1] avec l'ajout de BSA sans AGL (0,004 %) [2] ; EDTA (5 µM) [3] ; LRT (0,26 mmol/L TG) [4] ; PE (0,25 mmol/L TG) [5] ; Ox-LRT (0,26 mmol/L TG) [6] ; Ox-PE (0,25 mmol/L TG) [7] ; Vx-LRT (0,26 mmol/L TG) [8] ; Vx-PE (0,25 mmol/L TG) [9] ; PLA2-LRT (0,24 mmol/L TG) [10] ; et PLA2-PE (0,24 mmol/L TG) [11].

2.8 Viabilité cellulaire

La toxicité cellulaire a été évaluée en mesurant l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant libérée par les cellules endommagées, mortes ou lysées, à l'aide d'un kit disponible dans le commerce (Roche Diagnostics). Pour chaque échantillon, 50 µL de surnageant ont été prélevés à la fin du temps d'incubation et mélangés à 50 µL de mélange réactionnel (colorant : catalyseur = 45 : 1) sur une plaque à 96 puits, et exécutés en double. Le contrôle négatif (cytotoxicité la plus faible) consistait en un milieu de croissance frais sans sérum. Le contrôle positif (cytotoxicité la plus élevée) a été obtenu en ajoutant à un puits contenant des cellules non traitées 500 µL de milieu de croissance sans sérum contenant 1% de triton. L'absorbance a été mesurée à 490 nm après incubation dans l'obscurité, jusqu'à ce que le contrôle positif devienne rouge foncé. La cytotoxicité fut inférieure à 15%.

2.9 ELISA indirect

Des surnageants acellulaires ont été collectés pour quantifier la présence de marqueurs de l'inflammation (IL-1β et TNF-α) libérés par les cellules THP-1, à l'aide d'un kit ELISA IL-1β et TNF-α murins/humains suivant les instructions du fabricant (DuoSet(R) ELISA de R&D Systems, Inc). Les échantillons et l'étalon ont été testés en duplicata et les concentrations réelles ont été estimées sur la base d'une courbe standard aux concentrations connues d'IL-1β et de TNF-α.

2.10 Analyse statistique

Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type. Les données ont été analysées par le test t de Student bilatéral non apparié pour les comparaisons à deux groupes et l'ANOVA à un facteur pour la comparaison de plusieurs groupes avec les tests de comparaisons multiples de Dunnett à l'aide de GraphPad, Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA).

3 RÉSULTATS

3.1 Synthèse des PE par sonication générées à partir de LRT humains

L'objectif principal de ce projet fut d'étudier l'effet des lipides de type LRT sur l'inflammation dans le contexte de l'athérosclérose. On ne sait pas si l'action pro-inflammatoire des LRT est causée principalement ou uniquement par leurs composants lipidiques. Pour investiguer cette question, nous avons décidé d'utiliser des PE générées à partir des LRT humains. Elles représentent un modèle de nanoparticules humaines de type LRT, contenant uniquement des lipides provenant des LRT. La synthèse de PE à partir d'extraits lipidiques de LDL avait déjà été réalisée⁶⁵. Néanmoins, à notre connaissance, la fabrication de PE à partir d'extraits lipidiques de LRT n'avait jamais été réalisée auparavant.

La première tentative de synthèse des PE fut réalisée à l'aide de la technique d'extrusion qui utilise la mini-extrudeuse (Avanti(R) Polar lipids, États-Unis) pour la préparation des liposomes. Le principal avantage de l'utilisation de cet appareil était l'obtention de PE de taille très homogène. Cependant, il n'a été possible d'obtenir qu'1 mL de PE par manipulation et l'appareil fuyait fréquemment, ce qui entraînait souvent la perte du produit final. Nous avons donc décidé d'effectuer la synthèse par sonication.

La sonication fait référence au processus d'application de l'énergie sonore pour agiter des particules ou des fibres discontinues dans un liquide (Composites de carbone, deuxième édition, 2017). La stabilité des nano-fluides préparés dépend grandement du temps de sonication, et le temps nécessaire pour soniquer à l'aide d'un bain est beaucoup plus long qu'en utilisant un sonicateur (Brooker et al., 2008). Nous avons donc décidé de créer des PE à l'aide d'une sonde de sonication, dans l'optique de garantir un temps de sonication court afin d'augmenter la qualité du produit final, c'est à dire éviter une dégradation du produit final résultant en la création de populations hétérogènes de PE, ainsi qu'une perte de volume final par évaporation.

Différents temps de sonication ont été testés afin d'obtenir la taille voulue, c'est-à-dire une taille aussi proche que possible des LRT parents à partir desquels les lipides ont été extraits, afin d'éviter que la taille ne soit un facteur de confusion. Différentes conditions ont été testées pour optimiser la méthode. Nous avons constaté que le moyen le plus efficace en termes de qualité

était de conserver l'échantillon dans un bain chaud (environ 40 °C) pendant la sonication et de le laisser refroidir pendant environ 3 min entre chaque tour de 5 min.

Nous avons monitoré la taille des PE à l'aide de la diffusion dynamique de la lumière avec l'instrument Zetasizer Nano. Rapidement, il a été déterminé que la première mesure devait être effectuée après 15 min de temps de sonication. Avant 15 min, l'échantillon ne répondait pas aux critères de qualité, c'est-à-dire qu'il contenait des populations de particules très hétérogènes. Après 15 min de sonication (3 x 5 min), une mesure toutes les 5 minutes de sonication a été prise, donc c'est-à-dire à 20, 25 et 30 minutes de sonication. Comme le montre **la figure 9**, la taille des PE diminue linéairement avec le temps de sonication. Cependant, au-delà de 30 minutes de sonication, l'évaporation de l'échantillon fut trop importante et la taille des nanoparticules resta stable. De plus, les particules présentaient une taille uniforme de 172 nm.

Après 15 min de sonication, on pouvait observer deux pics que l'on pensait être des PE (largeur de pic à mi-hauteur 170,2, intensité 93,8 %) et de très grosses particules (largeur de pic à mi-hauteur 1132, intensité 6,2 %). Après 30 min de sonication, les PE étaient de taille plus homogène (largeur de pic à mi-hauteur 101,9, intensité 94,5 %), tandis que les particules de très grosse taille avaient évolué en deux groupes de grosses particules, de taille plus uniforme, représentés par deux pics (largeur de pic à mi-hauteur 654,8, intensité 3,4 % et largeur de pic à mi-hauteur 853,5, intensité 2,1 %). Avec le temps de sonication, les particules sont devenues plus petites et plus homogènes comme le montrait les pics obtenus à la fin qui se caractérisaient par une largeur de pic réduite et une intensité plus élevée (données non montrées).

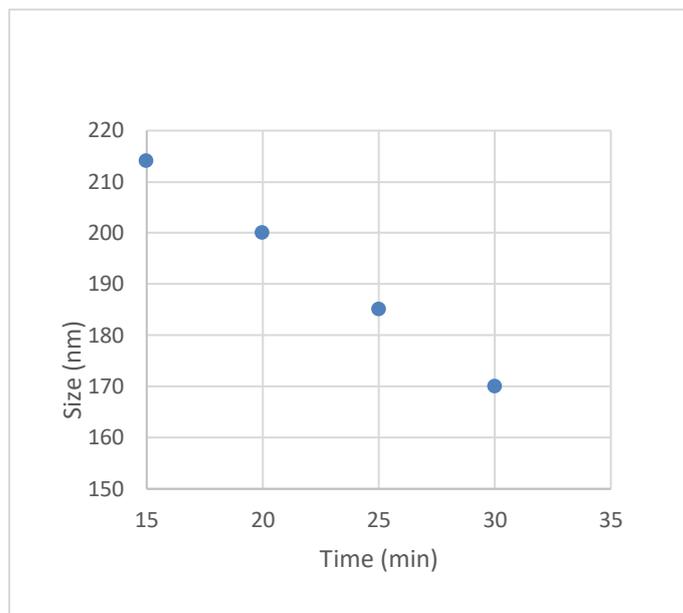


Figure 9 – Synthèse de particules d'émulsion par sonication à partir d'extrait lipidique de LRT. Les lipides ont été extraits à partir des LRT par la procédure d'extraction de Folch, séchés et reconstitués dans du PBS (+/+) pour être soniqués pendant 30 min (6 x 5 min). La taille a été mesurée à 15 min (215 nm), 20 min (200 nm), 25 min (185 nm) et 30 min (172 nm) de sonication. Données représentatives d'une expérience. Veuillez noter que les axes ne commencent pas à zéro.

La distribution granulométrique des LRT et des PE est illustrée à la **figure 10**. Leur taille moyenne était respectivement de 91 nm et 170 nm. La population des PE est plus hétérogène que celle de ses parents LRT, comme on peut le voir avec leur largeur de pic légèrement plus grande. De plus, on peut remarquer la présence de très grosses particules dans le mélange des PE représentée par des pics de très faible intensité sur le côté droit de la **figure 10.B**. Ces très grosses particules sont probablement des nanoparticules lipidiques qui n'ont pas subi de sonication. Cependant, leur proportion est très faible.

Lorsque le volume à soniquer était inférieur à 4 mL, l'échantillon surchauffait et s'évaporait. Il était également important de centrifuger les échantillons après la synthèse afin d'éliminer toutes impuretés métalliques qui auraient pu être libérées par la sonde. La sonde a été nettoyée avant et après chaque utilisation.

L'une des principales limites de cette méthode de fabrication des PE à partir de LRT fut l'obtention d'une quantité suffisante d'extrait lipidique. L'extraction des lipides à partir des LRT fut délicate car un volume important de lipides était nécessaire pour synthétiser les PE, et seulement 1 mL d'échantillon pouvait être extrait par tube KIMAX.

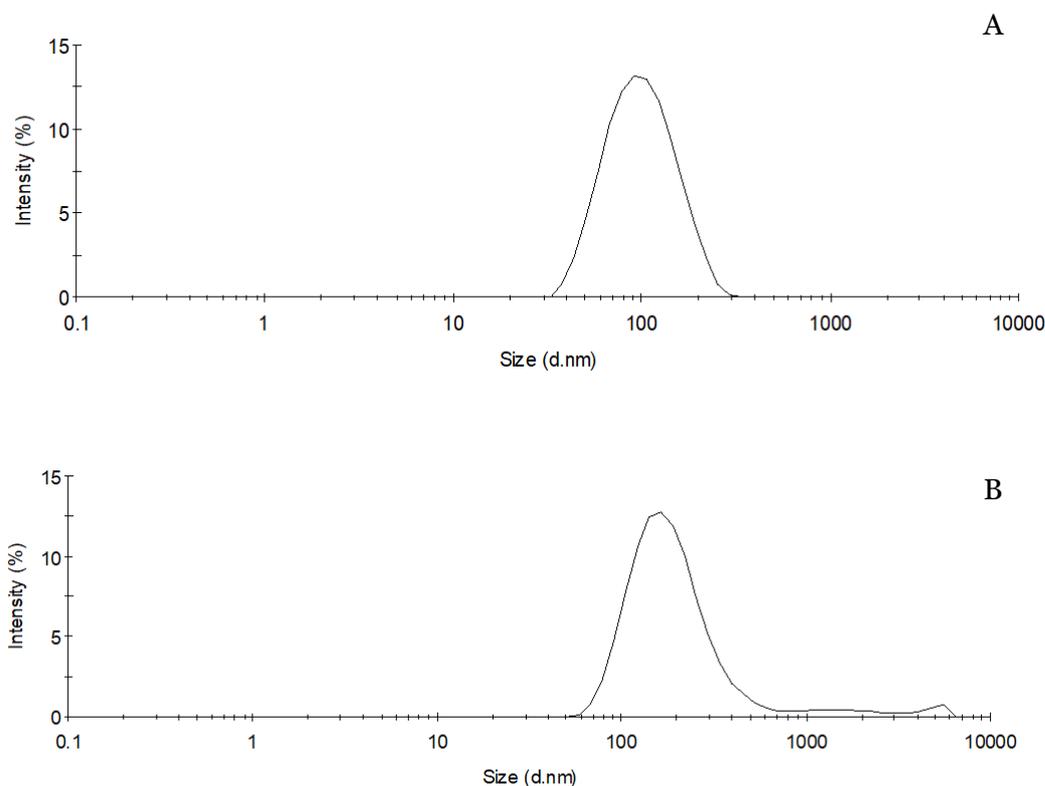


Figure 10 – Distribution granulométrique des lipoprotéines riches en triglycérides (LRT) (A) et des particules d'émulsion (PE) (B). Les LRT humaines (VLDL ($d = \leq 1,006$ g/mL) et IDL ($d = 1,006-1,019$ g/mL)) ont été isolées à partir de plasma mis en commun (poolé) de volontaires sains provenant du Service du sang de la Croix-Rouge finlandaise, à Helsinki (Finlande), par ultracentrifugation séquentielle, comme décrit dans les méthodes. Les particules d'émulsion ont été créées par sonication à l'aide d'extraits lipidiques générés à partir des LRT isolées. La taille des LRT (A) et des PE (B) a été mesurée à l'aide de l'instrument « Zetasizer Nano », 91 nm et 170 nm de diamètre respectivement. Données représentatives d'une expérience.

3.2 Caractérisation des lipides des LRT et des PE : concentration en cholestérol et triglycérides

La quantité de PE a été exprimée en fonction de leur teneur en TG. Les PE ne contenant pas de protéines, nous avons décidé de mesurer leur concentration en quantifiant les lipides, ici des TG. Les TG sont hydrolysés par la lipase en glycérol et en AG, dont la quantité a été déterminée. La méthode utilisée pour quantifier la teneur en cholestérol mesure à la fois le cholestérol estérifié et non estérifié (c'est-à-dire le cholestérol total). Les PE fabriquées contenaient la même quantité de cholestérol (1,17 mmol/L), et deux fois plus de TG que leurs parents LRT (5,04 mmol/L et 2,56 mmol/L respectivement). Cela s'est avéré bénéfique car cette haute concentration a permis une dilution, et donc un volume suffisant de PE pour les expérimentations ultérieures. Les PE et LRT contenaient la même quantité de cholestérol mais une quantité de TG différente.

3.3 Étude de la libération d'IL-1 β et de TNF- α par des macrophages traités avec des LRT et des PE

La lignée cellulaire THP-1 est une lignée de monocytes isolés du sang périphérique d'un patient atteint de leucémie monocyttaire aiguë. Ce type cellulaire est largement utilisé pour étudier la fonction et la régulation des macrophages dans le système cardiovasculaire^{66,67}. Les macrophages primaires dérivés de monocytes peuvent présenter une variation interindividuelle importante et un délai relativement court pendant lequel les expériences sont réalisables, et ne représentent donc pas le meilleur choix pour ce petit projet. Comme les cellules THP-1 sont connues pour se comporter relativement de la même manière que les macrophages primaires dérivés de monocytes, c'est ce que nous avons choisi pour cette étude. De plus, ce projet est aussi lié à d'autres expériences qui ont été et qui seront également réalisées avec des cellules THP-1.

La figure 11 décrit la sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α par les cellules THP-1 lorsqu'elles sont traitées avec des LRT par rapport aux PE, pour deux points de temps d'incubation différents, 3h et 18h.

3.3.1 Sécrétion d'IL-1 β par les cellules THP-1 traitées avec des PE ou avec des LRT

Comme le montre le graphique de gauche de la **figure 11**, la sécrétion d'IL-1 β a nettement augmenté à 3h de temps d'incubation pour les cellules traitées avec des PE en comparaison aux cellules non-traitées ($p < 0,05$), suivi d'une réduction de la concentration dans le milieu de culture cellulaire à 18h de temps d'incubation ($p > 0,05$), pour rejoindre le niveau d'IL-1 β sécrétée par les cellules traitées avec des LRT et les cellules non traitées ($p > 0,05$). Les cellules traitées avec des LRT se sont comportées de manière similaire aux cellules non traitées à 3h et à 18h de temps d'incubation ($p > 0,05$). Après 18h d'incubation, les groupes PE et LRT présentaient des niveaux d'IL-1 β similaires aux cellules non traitées ($p > 0,05$).

3.3.2 Sécrétion de TNF- α par les cellules THP-1 traitées avec des PE ou avec des LRT

Comme le montre le graphique de droite de la **figure 11**, les taux de TNF- α s ont augmenté lorsque les cellules furent traitées avec les PE, à 3h et 18h de temps d'incubation ($p < 0,05$). À 3h d'incubation les niveaux de TNF- α libérés par les cellules traitées avec des LRT sont similaires au control ($p > 0,05$). De manière intéressante, le traitement avec des LRT a eu comme effet de diminuer les niveaux de TNF- α après 18h d'incubation comparé au control ($p < 0,05$).

D'après ces résultats, les PE semblent induire la sécrétion de TNF- α par rapport aux cellules non traitées (temps d'incubation 3h et 18h ; $p < 0,05$).

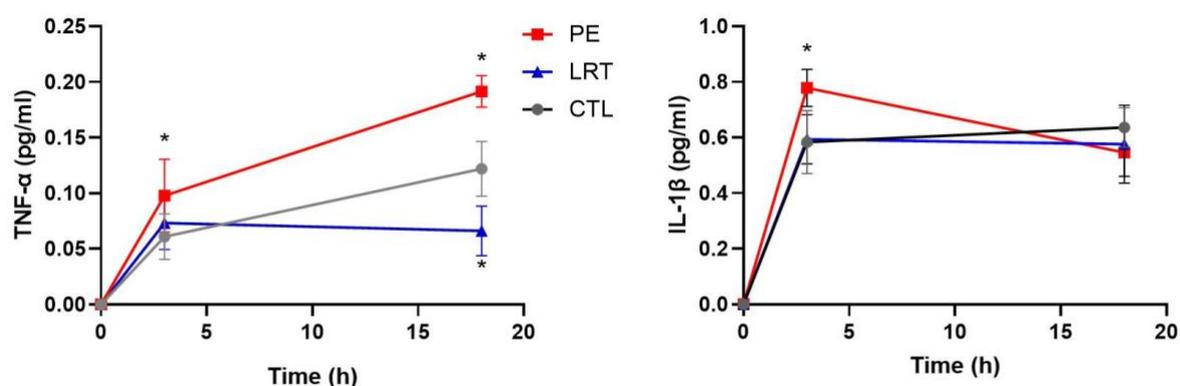


Figure 11 – Sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α par les cellules THP-1 traitées avec des LRT et des PE. Les cellules THP-1 ont été incubées avec LRT, PE ou PBS+/+ pendant une période allant jusqu'à 18 heures. La libération d'IL-1 β et de TNF- α a été quantifiée par ELISA indirect à 3h et 18h de temps d'incubation. Les données ont été analysées à l'aide du test ANOVA et du test de comparaison multiple de Dunnet. * indique des différences statistiquement significatives par rapport aux cellules traitées avec du PBS+/+ au même point de temps. n = 4. PE indique particules d'émulsion ; VLDL indique lipoprotéines de très basse densité ; et CTL, contrôle.

D'après ces résultats, le traitement des macrophages par les PE semble activer l'inflammation en stimulant la libération de TNF- α à 3h et 18h d'incubation, et d'IL-1 β à 3h d'incubation en comparaison à l'absence de traitement, ces résultats étant statistiquement significatifs. Le traitement des cellules par les LRT n'a pas eu d'effet sur la sécrétion d'IL-1 β et une diminution de la secretion de TNF- α a été observée par rapport aux cellules non traitées, statistiquement significatif à 18h de temps d'incubation.

3.4 Modifications des LRT et des PE

La **figure 12** décrit la sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α par les cellules THP-1 lorsqu'elles sont traitées avec des PE modifiées par rapport à des PE non modifiées, à 3h et 18h de temps d'incubation. Les modifications testées sont le mélange de PE (VxPE), la lipolyse des PE avec la PLA2 (PLA2-PE) et leur oxydation (OxPE).

3.4.1 LRT et PE modifiées par lipolyse avec la PLA2

PLA2 hydrolyse les phospholipides en lysophosphatidylcholine et AGNEs, favorisant la liaison des lipoprotéines avec les protéoglycanes *in vitro*^{65,68} ce qui peut potentiellement augmenter leur rétention dans l'intima. Il est connu que l'action des LDL modifiées avec la PLA2 sur les macrophages favorise la formation de cellules spumeuses^{58,59}. Nous savons aussi que les LRT modifiées par la PLA2 peuvent induire la sécrétion d'IL-1 β ⁷¹.

Les cellules THP-1 ont été incubées avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) sans AGL dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) comme témoin de cette condition, car les LRT modifiées par la PLA2 contenaient du BSA sans AGL. Selon le test de contrôle AGNE (*NEFA assay*), la réaction de lipolyse sur les LRT et PE fut limitée. En effet, les niveaux d'AGL détectés pour les LRT modifiées par PLA2 (41,4 μ M) et les PE modifiées par PLA2 (46,7 μ M) furent similaires à ceux détectés pour les LRT natives (25,4 μ M) et PE non modifiés (41,4 μ M). Le traitement des LRT et PE avec la PLA2 fut insuffisant.

La quantité d'AGNEs dans les PE non modifiées est étonnamment élevée. Il est donc possible que cette élévation ait rendu la détection d'une augmentation des AGNE difficile dans les PE modifiées. La lipolyse n'a pas échoué car les deux échantillons traités par la PLA2 contiennent plus d'AGNEs que leurs parents. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure d'identifier la cause de la lipolyse limitée. Aussi, comme les niveaux d'AGNEs sont plus élevés dans les PE que dans les LRT, cela pourrait indiquer que la sonication induit une certaine dégradation des lipides. On peut voir sur le graphique de gauche de la **figure 12** que la sécrétion d'IL-1 β est inférieure à celle des cellules traitées avec les PE non modifiées à 3h d'incubation ($p > 0,05$). À 18h de temps d'incubation, les niveaux sécrétés d'IL-1 β sont similaires à ceux des cellules non traitées ($p > 0,05$). Sur le graphique de droite, la libération de TNF- α par les cellules traitées au PLA2-PE est identique à celle des cellules traitées avec les PE non modifiées ($p > 0,05$).

3.4.2 LRT et PE modifiées par oxydation

Le principal résultat de l'oxydation est un changement des lipides et la formation d'adduits de malondialdéhyde (MDA) sur les résidus de lysine des protéines. L'oxydation diminue l'interaction des lipoprotéines avec les protéoglycanes mais augmente leur attachement au *decorin-coated* collagène via l'action de la LPL qui est responsable de leur accumulation au niveau du site lésionnel. La modification des lipoprotéines par oxydation a fait l'objet d'études

approfondies, et il est maintenant établi que les phospholipides oxydés sont pro-inflammatoires^{61,62}. Les LDL oxydés (OxLDL) induisent la formation de cellules spumeuses^{74,75}, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires^{65,66} et le dysfonctionnement des cellules endothéliales⁷⁸. Notamment, une oxydation importante peut conduire à la fragmentation de l'apoB²¹.

Selon le test TBARS, les PE ont été oxydées. La concentration de MDA ([MDA]) dans les PE non modifiées est de 2,78 μM et dans les PE oxydées (OxPE) est de 7,78 μM , ce qui donne un rapport ([MDA] dans les PE oxydés / [MDA] dans les PE non modifiées) égal à 2,80.

Cependant, le test TBARS n'est pas la meilleure méthode pour mesurer l'oxydation des PE. Par conséquent, d'autres méthodes devraient être envisagées à l'avenir. Comme nous n'avions pas réalisé d'oxydation des LRT, nous ne pouvons pas comparer l'effet des OxPE et des LRT oxydés sur la sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α . Nous nous étions concentrés sur l'effet de la modification par oxydation sur l'inflammation, en comparant la libération d'IL-1 β et de TNF- α par le THP-1 traitées avec les OxPE versus PE non modifiées.

On peut voir sur le graphique de gauche de la **figure 12** que la sécrétion d'IL-1 β est inférieure à celle des cellules traitées avec des PE non modifiées à 3h d'incubation ($p < 0,05$). À 18h d'incubation, la sécrétion reste inférieure à celle des cellules traitées avec les PE non modifiées ($p > 0,05$). Sur le graphique de droite **de la figure 12** on peut voir que la libération de TNF- α par les cellules traitées aux OxPE est inférieure à celle sécrétée par les cellules traitées avec les PE non modifiées à 3h et à 18h de temps d'incubation ($p > 0,05$). Les cellules traitées avec OxPE ont libéré moins de cytokines pro-inflammatoires que les cellules traitées avec des PE non modifiées. Dans l'ensemble, les OxPE ne semblent pas être plus pro-inflammatoires que leurs PE parents dans le cadre de notre expérience. Cela suggère que l'absorption de lipides oxydés seuls (sans la composante protéique) n'est pas suffisante pour induire une inflammation, et que les propriétés pro-inflammatoires des LRT oxydées devraient être étudiées plus en détail à l'avenir.

3.4.3 LRT et PE modifiées par vortex

Puisque vortexer les lipoprotéines et les PE induit leur agrégation, les VxLDL sont un modèle qui a été utilisé pour étudier l'accumulation de lipides dans les macrophages, conduisant à la

formation de cellules spumeuses^{79,80}. Il est établi que l'absorption de VxLDL par les macrophages active des gènes impliqués dans l'inflammation^{81,82}.

On peut voir sur le graphique de gauche de la **figure 12** que la sécrétion d'IL-1 β par les cellules traitées avec les VxEP est inférieure à celle des cellules traitées avec des PE à 3h d'incubation ($p < 0.05$), et similaire à celle-ci à 18h de temps d'incubation ($p > 0.05$). Le graphique de droite de la **figure 12** montre que la sécrétion de TNF- α par les cellules traitées avec des VxPE est similaire à celle des cellules traitées avec les PE non modifiées à 3h ($p > 0,05$). Cependant, à 18 h d'incubation, la sécrétion de TNF- α est plus faible qu'à 3h, et beaucoup plus faible que pour les autres conditions (PE, PLA2-PE and OxPE) et cette différence est statistiquement significative.

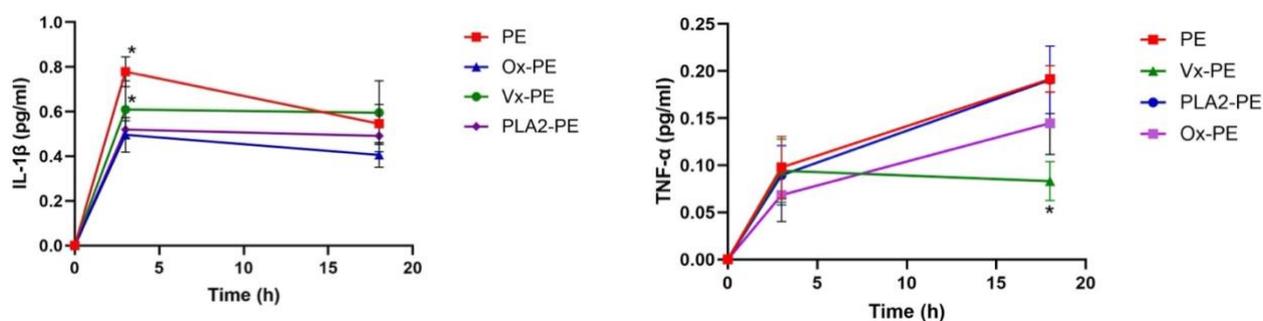


Figure 12 - Sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α par des cellules THP-1 traitées avec des PE non modifiées et des PE modifiées. Les cellules THP-1 ont été incubées avec des PE non modifiées ou des PE modifiées par oxydation (OxPE), PE mélangées par vortex (VxPE), PE modifiées par la PLA2 (PLA2-PE) pendant une période allant jusqu'à 18 heures. La libération d'IL-1 β et de TNF- α a été quantifiée par ELISA indirect aux temps d'incubation 3h et 18h. Les données ont été analysées à l'aide du test d'ANOVA et du test de comparaison multiple de Dunnet. * indique des différences statistiquement significatives par rapport aux cellules traitées avec des PE au même moment. $n = 4$. PE indique une particule d'émulsion ; VxPE, particules d'émulsion vortexées ; PLA2-PE, particules d'émulsion traitées à la phospholipase A2 ; et OxPE, particules d'émulsion oxydées.

D'après ces résultats, le traitement des macrophages par les PE semble activer l'inflammation en stimulant la libération de TNF- α à 3h et 18h d'incubation, et d'IL-1 β à 3h d'incubation en comparaison à l'absence de traitement, ces résultats étant statistiquement significatifs. Le

traitement des cellules par les LRT n'a pas eu d'effet sur la sécrétion d'IL-1 β et une diminution de la sécrétion de TNF- α a été observée par rapport aux cellules non traitées, statistiquement significatif à 18h de temps d'incubation.

4 DISCUSSION

Au début du projet, notre hypothèse fut que la composante protéique est essentielle à l'activation pro-inflammatoire des macrophages et de ce fait, les PE, ne contenant pas de protéines, induiraient peu ou pas d'inflammation comparé à leurs parents LRT.

Nos résultats montrent que les PE favorisent l'inflammation en induisant une libération d'IL-1 β et de TNF- α par les cellules THP-1, qui est plus importante que celle induite par les cellules traitées avec des LRT et par les cellules non-traitées. Ces résultats sont surprenants, en particulier ceux obtenus pour la sécrétion de TNF- α car on a pu observer un effet anti-inflammatoire avec les LRT alors qu'il est documenté dans la littérature qu'ils augmentent la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α par les macrophages^{83,84,85}. Également, les PE induisent de l'inflammation alors que leurs parents LRT diminuent l'inflammation. Ici, les PE augmentent très fortement la libération de TNF- α mais du fait que le traitement par les VLDL ait une action anti-inflammatoire qui est contraire aux données de la littérature, il est difficile d'interpréter nos résultats. Des niveaux élevés d'AGNE présents dans les PE non modifiées pourraient être l'une des raisons de l'activation des macrophages plus importante par les PE que par les LRT, ce qui renforcerait l'hypothèse que les AGL sont pro-inflammatoires.

Il est également important de remarquer que le contrôle négatif induit la libération de cytokines pro-inflammatoires à un niveau similaire qu'en présence de LRT connues pour activer la sécrétion de cytokines. Il est primordial d'investiguer la cause de cette activation macrophagique en présence du contrôle négatif, car ces cellules ont été simplement incubées avec du milieu de culture sans sérum. Il est possible que l'absence de sérum dans le milieu de culture ait constitué un environnement nutritivement pauvre et donc stressant pour les macrophages, qui se seraient mis à sécréter des molécules pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , en particulier à 3h et le TNF- α , à 18h. Cependant, ce milieu de culture sans sérum est également utilisé pour toutes les conditions (présence soit de LRT soit de PE) donc on peut se poser soit la question de l'intérêt de ce contrôle négatif qui ne donne pas une situation basale 'non inflammatoire' soit la question de l'absence d'effets des LRT qui devraient activer l'inflammation par rapport à une condition sans LRT.

Il convient de noter qu'il existe une nette différence entre la sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α . Le traitement des cellules macrophagiques THP-1 avec des PE non modifiées et des PE modifiées semble augmenter la sécrétion d'IL-1 β (3h) qui diminue ensuite avec le temps (18h), mais sans revenir au niveau de base. En revanche, la concentration de TNF- α dans le milieu de culture cellulaire a augmenté après 3h de traitement et a continué à augmenter à 18h d'incubation, sauf pour le groupe des macrophages traités avec VxEP. Cela pourrait signifier que ces deux cytokines pro-inflammatoires sont régulées différemment dans le cadre de notre expérience. L'activation canonique de l'inflammasome implique l'engagement de deux voies de signalisation indépendantes. Premièrement, l'amorçage est l'étape qui induit l'expression de l'IL-1 β et des polypeptides *NLR family pyrin domain containing 3* (NLRP3) et se produit via l'activation des *Toll-like receptors*, tels que TLR2 ou TLR4, ou de récepteurs liés à des voies inflammatoires telles que le récepteur du TNF- α (TNFR) ou de l'IL1 (IL1R). TNF- α peut se lier aux récepteurs du TNF- α de type 1 et 2 (TNFR1 et TNFR2) et activer des voies de signalisation pro-inflammatoires comme le NF- κ B et les *mitogen-activated protein kinases* (MAPK)⁸⁶. Ces voies convergent vers la voie de signalisation du *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer* (NF- κ B), un facteur de transcription commun en aval. L'activation de NF- κ B entraîne l'expression de NLRP3 et d'IL-1 β . Secondement, l'assemblage du complexe macromoléculaire de l'inflammasome NLRP3 active à son tour la caspase 1 pour cliver la pro-IL-1 β en sa forme active⁸⁷. La libération de l'IL-1 β survient secondairement à la libération de TNF- α , ce qui ne va pas à l'encontre de nos résultats où l'augmentation du TNF- α continue jusqu'à 18h alors que l'IL-1 β augmente à 3h puis diminue à 18h. Il est possible que l'activation de NF- κ B par le TNF- α soit insuffisante pour maintenir la sécrétion de l'IL-1 β jusqu'à 18h. Connaître les différents types de lipides qui composent les PE est essentiel afin de comprendre la cause de la différence de cinétique de sécrétion de l'IL-1 β et du TNF- α . Il serait intéressant de traiter des cellules macrophagiques avec différentes classes de lipides libres, ainsi que ces mêmes lipides mais assemblés sous forme de PE. De ce fait, nous pourrions gagner de nouvelles perspectives sur l'effet spécifique de certains lipides, ainsi que sur l'effet de l'organisation de ces mêmes lipides (sphériques ou libres) sur l'inflammation.

Utiliser un milieu de culture sans sérum pour le traitement des cellules THP-1 a permis de limiter les variables confondantes car le SVF contient des lipoprotéines. La normalisation a été effectuée en soustrayant l'absorbance de fond mesurée de l'échantillon vierge. L'une des limites de l'étude fut l'hétérogénéité en taille des particules car les PE étaient plus grandes que leurs LRT parents. Cependant, notre approche permet d'étudier l'effet des lipides sur les cellules car

nous pensons que la composition qualitative des lipides est le principal facteur à prendre en considération pour l'étude du rôle des lipides dans l'inflammation induite par les LRT, dans le contexte de la MCAS. À notre connaissance, c'est la première fois que des PE sont générées à partir d'extraits lipidiques LRT humains. Pour se faire nous nous sommes inspirés d'une méthode déjà établie dans notre groupe pour synthétiser des PE à partir de lipides extraits de LDL. Une raison pour laquelle la reconstitution des lipides extraits des LRT sous forme de PE n'a pas pu aboutir à une taille similaire aux LRT parents pourrait être leur teneur faible teneur en cholestérol et haute teneur en triglycérides. Ceci constitue la différence principale entre les LDL et LRT. Il est possible que former des PE par sonication à partir d'un mélange de lipides composé majoritairement de triglycérides et phospholipides (i.e. LRT) est plus complexe qu'à partir d'un mélange de lipides composé majoritairement de cholestérol et de phospholipides (LDL). Une autre différence majeure est le ratio lipides/protéines qui est plus élevé pour les LRT comparé aux LDL^{88,89}, ce qui pourrait jouer un rôle dans la difficulté que nous avons rencontrée pour la fabrication des PE.

Un contrôle positif aurait été nécessaire afin que nous puissions valider les manipulations faites. Un contrôle positif valide aurait pu être un traitement par des LDL oxydés car il est documenté qu'ils sont très pro-inflammatoires^{90,91}, ou bien traiter les cellules THP-1 avec des cristaux de cholestérol. Les LDL modifiés par oxydation (OxLDL) sont largement retrouvés dans les plaques d'athérosclérose et sont phagocytés par les macrophages qui se transforment en cellules spumeuses, cellules caractérisant les stries lipidiques observables sur les artères humaines. Nous avons pour objectif de modifier des PE par oxydation (OxPE) et d'étudier leurs effets sur l'inflammation *in vitro*. Étonnamment, la modification par oxydation n'a pas rendu les PE plus pro-inflammatoires.

Les phospholipases sont des enzymes qui hydrolysent les phospholipides. Le groupe A2 des phospholipases hydrolyse spécifiquement la liaison ester de l'acide gras en position sn-2 des glycérophospholipides et, ce faisant, libère à la fois les acides gras et les lysophospholipides. La concentration circulante et l'activité enzymatique de la phospholipase A2 sécrétoire (sPLA2) et de la phospholipase A2 associée aux lipoprotéines (Lp-PLA2) ont été évaluées en tant que biomarqueurs du risque cardiovasculaire dans des populations d'individus apparemment sains, ainsi que chez des patients souffrant d'une maladie coronarienne établie⁹². La PLA2 sécrétoire (sPLA2) hydrolyse les phospholipides de la surface des membranes cellulaires, des lipoprotéines natives et des lipoprotéines modifiées par oxydation pour produire de nombreux

lipides bioactifs différents. En revanche, la Lp-PLA2 a besoin de phospholipides oxydés comme substrat. La libération de TNF- α par les cellules traitées au PLA2-PE est identique à celle des cellules traitées avec les PE non modifiées ($p > 0,05$), ce qui coïncide avec la lipolyse insuffisante des PE. Cette étude a montré que les PE semblent favoriser l'inflammation, contrairement à leurs formes modifiées. Cette observation est étonnante car il a été démontré au sein du laboratoire que les LRT modifiées induisent la sécrétion de cytokines. Il faudra étudier si cela peut être dû à une différence au niveau de l'absorption entre les PE et les LRT par les macrophages.

Les macrophages absorbent les LRT via leurs récepteurs scavengers et par le récepteur aux VLDL. Ce dernier interagit avec un ligand contenant l'apolipoprotéine E. Lei Deng et al. (2022) ont montré que des PE synthétiques enrichies en TG d'une taille similaire aux VLDL sont absorbées par endocytose médiée par les cavéoles¹⁰⁰. Il est aussi documenté que les VLDL induisent la formation de cellules spumeuses par la voie des récepteurs VLDL dans les macrophages, et la modification des particules VLDL par acétylation entraîne la formation de cellules spumeuses dans les macrophages par l'absorption des particules modifiées, médiée par les récepteurs scavenger^{101,22}. Comme nos PE ne contiennent normalement pas de protéines, leur absorption pourrait être médiée par les récepteurs scavengers plutôt que par le récepteur aux VLDL.

Pendant cette étude, nous avons observé que les PE fabriquées contenaient deux fois plus de TG que leurs parents LRT. Nous ne savons pas pourquoi le ratio a été modifié et cela doit être étudié, mais il est difficile de se prononcer sans connaître la composition exacte en phospholipides. Une explication possible est que nous avons rencontré une perte de cholestérol pendant les processus d'extraction, de sonication ou de concentration. Le cholestérol a une structure moléculaire bien différente des phospholipides et il est possible qu'à une certaine étape de la fabrication des PE, le cholestérol n'a pas pu s'organiser sous forme de micelle avec les phospholipides, a précipité et a été éliminé lors de la filtration stérile qui a suivi leur fabrication par sonication. Une autre raison peut être que la mesure du cholestérol ou des TG n'était pas assez précise.

Nos travaux apportent définitivement quelque chose de nouveau car la synthèse des PE à partir de lipoprotéines physiologiques isolées de plasma humain permet de représenter au mieux la diversité des lipides inhérente aux populations de lipoprotéines physiologiques humaines. Le

but de cette étude fut d'analyser l'effet global des lipides composant les lipoprotéines riches en triglycérides. Il faudrait ultérieurement déterminer l'identité des lipides qui composent les LRT et les PE dérivés de ceux-ci, par spectrométrie de masse, afin de pouvoir interpréter les différences entre la sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α . Identifier les différents types de lipides permettrait également de confirmer la conservation de l'intégrité des lipides depuis leur extraction à partir des LRT jusqu'à leur assemblage sous forme de PE.

L'athérosclérose est actuellement bien traitée sur son versant lipidique. Les objectifs de diminution de baisse de cholestérol circulant sont bien atteints avec ces médicaments tels que les statines mais cela ne suffit pas car il existe un risque résiduel qui est dû à la composante inflammatoire de la plaque. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique. L'inflammation est une composante essentielle de la maladie cardiovasculaire, car il a été démontré que la réduction de l'inflammation en bloquant les voies des cytokines diminue le risque d'accident vasculaire cérébral et d'infarctus du myocarde^{93,94}. L'inflammation augmente le nombre de clones de leucocytes dans le sang périphérique, il est donc primordial d'étudier le comportement des macrophages au niveau de l'athérome et dans la circulation. L'identification et la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à l'activation des macrophages par les LRT et les LRT modifiées, ainsi que leur absorption au niveau de la lésion athéroscléreuse apporteront de nouvelles perspectives pour le développement de thérapies visant à prévenir la formation des plaques d'athérosclérose, à stabiliser les plaques et, espérons-le, pouvant même aider à réduire les plaques déjà existantes.

Le repositionnement de biothérapies anti-inflammatoires utilisées dans d'autres maladies inflammatoires constituerait une nouvelle piste thérapeutique pour le traitement de l'athérosclérose. Cela permettrait de cibler la composante inflammatoire de la maladie ce qui pourrait réduire le risque résiduel cardiovasculaire. Un avantage du repositionnement médicamenteux est le délai de développement raccourci ainsi que de bénéficier de la connaissance déjà acquise sur le médicament.

Un exemple récent est celui du dupilumab (Dupixent[®]), anticorps monoclonal qui cible spécifiquement les récepteurs de l'IL-4 et de l'IL-13. Son action bloque la voie de signalisation de ces cytokines, réduisant ainsi l'inflammation et les symptômes associés à des affections telles que la dermatite atopique, l'asthme ou la polypose nasale⁹⁵. TNF- α est élevé dans des maladies inflammatoires comme le psoriasis et l'arthrite rhumatoïde et certaines thérapies qui visent à

diminuer l'activation inflammatoire liée au TNF- α sont efficaces, comme l'etanercept, un bloqueur du TNF- α . L'etanercept est un récepteur soluble et protéine de fusion qui se lie au TNF- α et l'inactive. Il existe aussi des biothérapies anticorps monoclonaux qui vont neutraliser le TNF- α comme l'infliximab, l'adalimumab et le golimumab et qui se sont avérées efficaces dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (RCH).

Il existe aussi des anti-IL-1 β comme le canakinumab. Le canakinumab est un anticorps monoclonal qui se lie avec haute affinité à l'IL-1 β humaine et neutralise son activité biologique en inhibant son interaction avec les récepteurs à l'IL-1, empêchant ainsi l'activation génique induite par l'IL-1 β et la synthèse de médiateurs inflammatoires⁹⁶. Il est indiqué chez l'adulte dans le traitement de la crise de goutte (deuxième intention) et de la maladie de Still (deuxième intention) et chez l'enfant dans le traitement de la polyarthrite chronique juvénile (deuxième intention). Il a aussi une indication pour la fièvre méditerranéenne.

Il serait intéressant de traiter des cellules macrophagiques avec des PE et des LRT en présence d'anti-inflammatoires et d'étudier l'effet sur la libération d'IL-1 β et du TNF- α afin de déterminer leur impact sur l'inflammation *in vitro*. Des études *in vivo* sur les souris ont montré qu'entraver la voie de signalisation NLRP3/IL-1 β réduit significativement le développement de la plaque athéroscléreuse et inflammation⁹⁷. Le canakinumab a montré une réduction de 15% de la fréquence des infarctus du myocarde non mortels ou de mort cardiovasculaire (phase 3 CANTOS)¹³. Aussi, une deuxième analyse réalisée dans ce même essai clinique a révélé une réduction de 31% de mortalité toutes causes confondues et de la mortalité cardiovasculaire chez les patients traités par le canakinumab. Ainsi, le canakinumab s'est avéré être la première thérapie anti-inflammatoire avec des effets bénéfiques prouvés dans un essai clinique de phase 3 de grande ampleur chez les patients atteints d'athérosclérose contrôlée.

Anakinra est un antagoniste du récepteur à l'IL-1 β en cours d'essai clinique de phase 2/3 qui a pour paramètre principal le changement de la protéine C-réactive (CRP) chez des patients avec angioplastie coronaire pour infarctus du myocarde avec élévation du segment ST (STEMI) (NCT01950299). Dans un précédent essai clinique de phase 2, 14 jours de traitement avec l'anakinra a diminué les niveaux de CRP par rapport au groupe placebo, mais 30 jours après le traitement les niveaux ont augmenté à nouveau ayant même atteint un niveau supérieur au groupe sans traitement⁹⁸. L'anakinra est indiqué dans le COVID-19 chez le sujet à risque

nécessitant une oxygénothérapie, dans la polyarthrite rhumatoïde (deuxième intention) et la maladie de Still (deuxième intention). Il a aussi une indication pour la fièvre méditerranéenne.

D'autres thérapies visant l'IL-6, le NLRP3 directement avec des inhibiteurs du NLRP3 ou indirectement avec la colchicine représentent des candidats de repositionnement médicamenteuse⁹⁹.

5 CONCLUSION

L'objectif de ce projet fut d'étudier l'impact de la composante lipidique des lipoprotéines sur l'inflammation dans le contexte de l'athérosclérose. Pour ce faire, nous avons poursuivi trois objectifs. Dans un premier temps, nous avons développé avec succès une méthode de synthèse de particules d'émulsion (PE) générées à partir de lipoprotéines riches en triglycérides humains (LRT : Chylomicrons, VLDL, IDL). La taille des PE et des LRT ne fut pas identiques mais leur teneur en triglycérides et en cholestérol fut similaire. Deuxièmement, nous avons étudié la libération de cytokines spécifiques de l'inflammation (IL-1 β et TNF- α) par les cellules THP-1 différenciées en macrophages, traitées avec des LRT. De manière surprenante, le traitement par les LRT n'a pas eu d'effet pro-inflammatoire sur les cellules macrophagiques. Troisièmement, nous avons étudié la libération de cytokines spécifiques de l'inflammation (IL-1 β et TNF- α) par les cellules THP-1 différenciées en macrophages, traitées avec des PE et des PE modifiées, et nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus avec les LRT. Cette étude a montré que les PE semblent favoriser l'inflammation, contrairement à leurs formes modifiées.

Dans l'ensemble, il est difficile de conclure sur l'effet des lipides sur l'inflammation, car les LRT n'ont pas exercé d'effet inflammatoire dans notre expérience par rapport aux cellules non traitées. À l'avenir, nous devons premièrement observer de l'inflammation causée par les LRT par rapport aux cellules non traitées avant de pouvoir effectuer une comparaison avec le traitement par des PE.

Ce travail peut permettre de contribuer à l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques nécessaires au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le contexte de l'athérosclérose qui est la première cause de mortalité mondiale malgré l'avènement des traitements hypolipémiants. Ce projet s'est concentré sur le risque résiduel dans le but de mieux le comprendre afin d'optimiser sa gestion à l'avenir.

6 RÉFÉRENCES

1. Henaux, S. Prise en charge de l'infarctus du myocarde. *L'Aide-Soignante* **27**, 29–30 (2013).
2. Libby, P. *et al.* Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 1–18 (2019).
3. Feingold, K. R. Introduction to Lipids and Lipoproteins. in *Endotext* (eds. Feingold, K. R. et al.) (MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA), 2000).
4. Xiao, S. *et al.* Macrophage fatty acid oxidation in atherosclerosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **170**, 116092 (2024).
5. Silvis, M. J. M. *et al.* Immunomodulation of the NLRP3 Inflammasome in Atherosclerosis, Coronary Artery Disease, and Acute Myocardial Infarction. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* **14**, 23–34 (2021).
6. Barquera, S. *et al.* Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arch Med Res* **46**, 328–338 (2015).
7. Higgins, L. J. & Rutledge, J. C. Inflammation associated with the postprandial lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase. *Curr Atheroscler Rep* **11**, 199–205 (2009).
8. Björkegren, J. L. M. & Lusis, A. J. Atherosclerosis: Recent developments. *Cell* **185**, 1630–1645 (2022).
9. Tanase, D. M. *et al.* Portrayal of NLRP3 Inflammasome in Atherosclerosis: Current Knowledge and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* **24**, 8162 (2023).
10. Grundy, S. M. *et al.* 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: Executive Summary. *Circulation* **139**, e1082–e1143 (2019).
11. Collaboration, C. T. T. (CTT). Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials. *The Lancet* **376**, 1670–1681 (2010).
12. Goldstein, J. L. & Brown, M. S. History of Discovery: The LDL Receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 431–438 (2009).

13. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine* **377**, 1119–1131 (2017).
14. Biglarian, M., Firoozabadi, B. & Saidi, M. S. Atheroprone sites of coronary artery bifurcation: Effect of heart motion on hemodynamics-dependent monocytes deposition. *Computers in Biology and Medicine* **133**, 104411 (2021).
15. Williams, K. J. & Tabas, I. The Response-to-Retention Hypothesis of Early Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 551–561 (1995).
16. Gimbrone, M. A. & García-Cardena, G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* **22**, 9–15 (2013).
17. Zaromitidou, M., Siasos, G., Papageorgiou, N., Oikonomou, E. & Tousoulis, D. Chapter 2 - Atherosclerosis and Coronary Artery Disease: From Basics to Genetics. in *Cardiovascular Diseases* (ed. Papageorgiou, N.) 3–24 (Academic Press, Boston, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-803312-8.00002-1.
18. Öörni, K., Pentikäinen, M. O., Ala-Korpela, M. & Kovanen, P. T. Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J Lipid Res* **41**, 1703–1714 (2000).
19. Björnson, E. *et al.* Apolipoprotein B48 metabolism in chylomicrons and very low-density lipoproteins and its role in triglyceride transport in normo- and hypertriglyceridemic human subjects. *J Intern Med* **288**, 422–438 (2020).
20. Öörni, K. & Kovanen, P. T. Aggregation Susceptibility of Low-Density Lipoproteins-A Novel Modifiable Biomarker of Cardiovascular Risk. *J Clin Med* **10**, 1769 (2021).
21. Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H. & Jürgens, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* **13**, 341–390 (1992).
22. Lorey, M. B., Öörni, K. & Kovanen, P. T. Modified Lipoproteins Induce Arterial Wall Inflammation During Atherogenesis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* **9**, (2022).
23. Kavurma, M. M., Rayner, K. J. & Karunakaran, D. The Walking Dead: Macrophage inflammation and death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **28**, 91–98 (2017).

24. Singh, B. *et al.* Defective efferocytosis of vascular cells in heart disease. *Front Cardiovasc Med* **9**, 1031293 (2022).
25. Dhawan, U. K., Singhal, A. & Subramanian, M. Dead cell and debris clearance in the atherosclerotic plaque: Mechanisms and therapeutic opportunities to promote inflammation resolution. *Pharmacological Research* **170**, 105699 (2021).
26. Xu, Y.-J., Zheng, L., Hu, Y.-W. & Wang, Q. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* **476**, 28–37 (2018).
27. Degtarev, A. *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* **1**, 112–119 (2005).
28. Karunakaran, D. *et al.* Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis. *Sci Adv* **2**, e1600224 (2016).
29. Leeper, N. J. The Role of Necroptosis in Atherosclerotic Disease. *JACC: Basic to Translational Science* **1**, 548–550 (2016).
30. Martins, I. J., Mortimer, B. C., Miller, J. & Redgrave, T. G. Effects of particle size and number on the plasma clearance of chylomicrons and remnants. *J Lipid Res* **37**, 2696–2705 (1996).
31. German, J. B., Smilowitz, J. T. & Zivkovic, A. M. Lipoproteins: When size really matters. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **11**, 171–183 (2006).
32. Guha, M. & Gursky, O. Effects of Oxidation on Structural Stability and Remodeling of Human Very Low Density Lipoprotein. *Biochemistry* **49**, 9584–9593 (2010).
33. Trajkovska, K. T. & Topuzovska, S. High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: strategies for raising HDL cholesterol. *Anatol J Cardiol* **18**, 149–154 (2017).
34. Ference, B. A. *et al.* Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* **38**, 2459–2472 (2017).
35. Borén, J. *et al.* Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* **41**, 2313–2330 (2020).

36. Ginsberg, H. N. *et al.* Triglyceride-rich lipoproteins and their remnants: metabolic insights, role in atherosclerotic cardiovascular disease, and emerging therapeutic strategies—a consensus statement from the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* **42**, 4791–4806 (2021).
37. Proctor, S. D., Vine, D. F. & Mamo, J. C. L. Arterial Permeability and Efflux of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins Assessed by In Situ Perfusion and Three-Dimensional Quantitative Confocal Microscopy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**, 2162–2167 (2004).
38. Opie, L. H. & Walfish, P. G. Plasma free fatty acid concentrations in obesity. *N Engl J Med* **268**, 757–760 (1963).
39. Arner, P. & Rydén, M. Fatty Acids, Obesity and Insulin Resistance. *Obes Facts* **8**, 147–155 (2015).
40. Keirns, B. H., Sciarrillo, C. M., Koemel, N. A. & Emerson, S. R. Fasting, non-fasting and postprandial triglycerides for screening cardiometabolic risk. *J Nutr Sci* **10**, e75 (2021).
41. Ganda, O. P., Bhatt, D. L., Mason, R. P., Miller, M. & Boden, W. E. Unmet Need for Adjunctive Dyslipidemia Therapy in Hypertriglyceridemia Management. *J Am Coll Cardiol* **72**, 330–343 (2018).
42. Laufs, U., Parhofer, K. G., Ginsberg, H. N. & Hegele, R. A. Clinical review on triglycerides. *European Heart Journal* **41**, 99–109c (2020).
43. Nordestgaard, L. T. *et al.* Triglycerides as a Shared Risk Factor between Dementia and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Study of 125 727 Individuals. *Clin Chem* **67**, 245–255 (2021).
44. Balling, M. *et al.* Elevated LDL Triglycerides and Atherosclerotic Risk. *Journal of the American College of Cardiology* **81**, 136–152 (2023).
45. Nordestgaard, B. G. Triglyceride-Rich Lipoproteins and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: New Insights From Epidemiology, Genetics, and Biology. *Circ Res* **118**, 547–563 (2016).
46. Egan, B. M., Greene, E. L. & Goodfriend, T. L. Nonesterified fatty acids in blood pressure control and cardiovascular complications. *Curr Hypertens Rep* **3**, 107–116 (2001).

47. Boden, G. Obesity and Free Fatty Acids (FFA). *Endocrinol Metab Clin North Am* **37**, 635–ix (2008).
48. Haus, J. M. *et al.* Free Fatty Acid-Induced Hepatic Insulin Resistance is Attenuated Following Lifestyle Intervention in Obese Individuals with Impaired Glucose Tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 323–327 (2010).
49. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease | NEJM.
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm199901143400207>.
50. Dhaliwal, B. S. & Steinbrecher, U. P. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta* **286**, 191–205 (1999).
51. Poznyak, A. V. *et al.* Overview of OxLDL and Its Impact on Cardiovascular Health: Focus on Atherosclerosis. *Front Pharmacol* **11**, 613780 (2021).
52. Chang, H. R. *et al.* Role of LpL (Lipoprotein Lipase) in Macrophage Polarization In Vitro and In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **39**, 1967–1985 (2019).
53. Li, F. & Zhang, H. Lysosomal acid lipase in lipid metabolism and beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **39**, 850–856 (2019).
54. Skarlatos, S. I., Dichek, H. L., Fojo, S. S., Brewer, H. B. & Kruth, H. S. Absence of triglyceride accumulation in lipoprotein lipase-deficient human monocyte-macrophages incubated with human very low density lipoprotein. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **76**, 793–796 (1993).
55. den Hartigh, L. J., Altman, R., Norman, J. E. & Rutledge, J. C. Postprandial VLDL lipolysis products increase monocyte adhesion and lipid droplet formation via activation of ERK2 and NFκB. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **306**, H109–H120 (2014).
56. Kim, C. W., Oh, E.-T. & Park, H. J. A strategy to prevent atherosclerosis via TNF receptor regulation. *FASEB J* **35**, e21391 (2021).
57. Libby, P. Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: The Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J Am Coll Cardiol* **70**, 2278–2289 (2017).

58. Ruuth, M. *et al.* Susceptibility of low-density lipoprotein particles to aggregate depends on particle lipidome, is modifiable, and associates with future cardiovascular deaths. *European Heart Journal* **39**, 2562–2573 (2018).
59. Heffron, S. P. *et al.* Low-density lipoprotein aggregation predicts adverse cardiovascular events in peripheral artery disease. *Atherosclerosis* **316**, 53–57 (2021).
60. Skåln, K. *et al.* Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* **417**, 750–754 (2002).
61. Havel, R. J., Eder, H. A. & Bragdon, J. H. THE DISTRIBUTION AND CHEMICAL COMPOSITION OF ULTRACENTRIFUGALLY SEPARATED LIPOPROTEINS IN HUMAN SERUM. *J Clin Invest* **34**, 1345–1353 (1955).
62. Radding, C. M. & Steinberg, D. STUDIES ON THE SYNTHESIS AND SECRETION OF SERUM LIPOPROTEINS BY RAT LIVER SLICES. *J Clin Invest* **39**, 1560–1569 (1960).
63. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497–509 (1957).
64. Steinbrecher, U. P., Parthasarathy, S., Leake, D. S., Witztum, J. L. & Steinberg, D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3883–3887 (1984).
65. Sneek, M. *et al.* Conformational changes of apoB-100 in SMase-modified LDL mediate formation of large aggregates at acidic pH [S]. *Journal of Lipid Research* **53**, 1832–1839 (2012).
66. Auwerx, J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* **47**, 22–31 (1991).
67. Qin, Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* **221**, 2–11 (2012).
68. Lähdesmäki, K. *et al.* Phospholipase A2-modified LDL particles retain the generated hydrolytic products and are more atherogenic at acidic pH. *Atherosclerosis* **207**, 352–359 (2009).

69. Menschikowski, M., Lattke, P., Bergmann, S. & Jaross, W. Exposure of macrophages to PLA2-modified lipoproteins leads to cellular lipid accumulations. *Anal Cell Pathol* **9**, 113–121 (1995).
70. Boyanovsky, B. B., Westhuyzen, D. R. van der & Webb, N. R. Group V Secretary Phospholipase A2-modified Low Density Lipoprotein Promotes Foam Cell Formation by a SR-A- and CD36-independent Process That Involves Cellular Proteoglycans *. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 32746–32752 (2005).
71. Lehti, S. *et al.* Extracellular Lipids Accumulate in Human Carotid Arteries as Distinct Three-Dimensional Structures and Have Proinflammatory Properties. *Am J Pathol* **188**, 525–538 (2018).
72. Binder, C. J., Papac-Milicevic, N. & Witztum, J. L. Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease. *Nat Rev Immunol* **16**, 485–497 (2016).
73. Luchetti, F. *et al.* LDL receptors, caveolae and cholesterol in endothelial dysfunction: oxLDLs accomplices or victims? *British Journal of Pharmacology* **178**, 3104–3114 (2021).
74. Witztum, J. L. You are right too! *J Clin Invest* **115**, 2072–2075 (2005).
75. Kaplan, M. & Aviram, M. Retention of Oxidized LDL by Extracellular Matrix Proteoglycans Leads to Its Uptake by Macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **21**, 386–393 (2001).
76. Pryma, C. S., Ortega, C., Dubland, J. A. & Francis, G. A. Pathways of smooth muscle foam cell formation in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* **30**, 117 (2019).
77. Contribution of Intimal Smooth Muscle Cells to Cholesterol Accumulation and Macrophage-Like Cells in Human Atherosclerosis | *Circulation*.
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005015>.
78. Yan, Y., Song, D., Wu, J. & Wang, J. Long Non-Coding RNAs Link Oxidized Low-Density Lipoprotein With the Inflammatory Response of Macrophages in Atherogenesis. *Front Immunol* **11**, 24 (2020).
79. Khoo, J. C., Miller, E., McLoughlin, P. & Steinberg, D. Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.* **8**, 348–358 (1988).

80. Zhao, B., Huang, W., Zhang, W.-Y., Ishii, I. & Kruth, H. S. Retention of aggregated LDL by cultured human coronary artery endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **321**, 728–735 (2004).
81. Sabeva, N. S. *et al.* Phytosterols differentially influence ABC transporter expression, cholesterol efflux and inflammatory cytokine secretion in macrophage foam cells. *J Nutr Biochem* **22**, 777–783 (2011).
82. Puig, N. *et al.* Electronegative LDL Promotes Inflammation and Triglyceride Accumulation in Macrophages. *Cells* **9**, 583 (2020).
83. Stollenwerk, M. M. *et al.* Very low density lipoprotein potentiates tumor necrosis factor-alpha expression in macrophages. *Atherosclerosis* **179**, 247–254 (2005).
84. Stollenwerk, M. M. *et al.* Very low-density lipoprotein induces interleukin-1beta expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **335**, 603–608 (2005).
85. Ares, M. P. & Stollenwerk, M. M. Inflammatory effects of very low-density lipoprotein and fatty acids. *Future Cardiology* **2**, 315–323 (2006).
86. Pan, A. & Gerriets, V. Etanercept. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
87. Williams, J. W., Huang, L. & Randolph, G. J. Cytokine Circuits in Cardiovascular Disease. *Immunity* **50**, 941–954 (2019).
88. Juarez Casso, F. M. & Farzam, K. Biochemistry, Very Low Density Lipoprotein. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
89. Bancells, C. *et al.* Proteomic analysis of electronegative low-density lipoprotein. *J Lipid Res* **51**, 3508–3515 (2010).
90. Liu, W., Yin, Y., Zhou, Z., He, M. & Dai, Y. OxLDL-induced IL-1 beta secretion promoting foam cells formation was mainly via CD36 mediated ROS production leading to NLRP3 inflammasome activation. *Inflamm Res* **63**, 33–43 (2014).
91. Bekkering, S. *et al.* Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 1731–1738 (2014).

92. Fras, Z., Tršan, J. & Banach, M. On the present and future role of Lp-PLA2 in atherosclerosis-related cardiovascular risk prediction and management. *Arch Med Sci* **17**, 954–964 (2020).
93. Zivkovic, S., Maric, G., Cvetinovic, N., Lepojevic-Stefanovic, D. & Bozic Cvijan, B. Anti-Inflammatory Effects of Lipid-Lowering Drugs and Supplements—A Narrative Review. *Nutrients* **15**, 1517 (2023).
94. Engelen, S. E., Robinson, A. J. B., Zurke, Y.-X. & Monaco, C. Therapeutic strategies targeting inflammation and immunity in atherosclerosis: how to proceed? *Nat Rev Cardiol* **19**, 522–542 (2022).
95. Dupixent | European Medicines Agency.
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/dupixent>.
96. Canakinumab : substance active à effet thérapeutique. VIDAL
<https://www.vidal.fr/medicaments/substances/canakinumab-23224.html>.
97. Baldridge, M., Mallat, Z. & Li, X. NLRP3 inflammasome pathways in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **267**, 127–138 (2017).
98. Morton, A. C. *et al.* The effect of interleukin-1 receptor antagonist therapy on markers of inflammation in non-ST elevation acute coronary syndromes: the MRC-ILA Heart Study. *Eur Heart J* **36**, 377–384 (2015).
99. Zhao, T. X. & Mallat, Z. Targeting the Immune System in Atherosclerosis: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* **73**, 1691–1706 (2019).
100. Deng, L. *et al.* Macrophages take up VLDL-sized emulsion particles through caveolae-mediated endocytosis and excrete part of the internalized triglycerides as fatty acids. *PLOS Biology* **20**, e3001516 (2022).
101. Öörni, K., Lehti, S., Sjövall, P. & Kovanen, P. T. Triglyceride-Rich Lipoproteins as a Source of Proinflammatory Lipids in the Arterial Wall. *Curr Med Chem* **26**, 1701–1710 (2019).
102. Orekhov, A. N. *et al.* Modified LDL Particles Activate Inflammatory Pathways in Monocyte-derived Macrophages: Transcriptome Analysis. *Current Pharmaceutical Design* **24**, 3143–3151.

103. Nordestgaard, L. T. *et al.* Triglycerides as a Shared Risk Factor between Dementia and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Study of 125 727 Individuals. *Clin Chem* **67**, 245–255 (2021).
104. Zhou, W. & Yuan, J. Necroptosis in health and diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **35**, 14–23 (2014).
105. Gautier, E. L. *et al.* Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation* **119**, 1795–1804 (2009).
106. Guoping, W., Zhongduan, D. & Juan, N. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in monocytes and effects of native and oxidized very low density lipoproteins. *Journal of Tongji Medical University* **17**, 203–205 (1997).
107. Wang, G.-P., Deng, Z.-D., Ni, J. & Qu, Z.-L. Oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein enhance expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rabbit peritoneal exudate macrophages. *Atherosclerosis* **133**, 31–36 (1997).
108. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275 (1951).
109. Tuzcu, E. M. *et al.* High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* **103**, 2705–2710 (2001).