

Université de Montréal

**Induction d'anticorps anti-idiotypiques contre les  
protéoglycanes de la matrice extracellulaire dans la réduction  
des lésions athérosclérotiques**

Par

Simon Giroux Portelance

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.)

en sciences pharmaceutiques

option pharmacologie

Novembre, 2012

© Simon Giroux Portelance, 2012

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Induction d'anticorps anti-idiotypiques contre les protéoglycanes de la matrice  
extracellulaire dans la réduction des lésions athérosclérotiques

Présenté par :

Simon Giroux Portelance

a été évalué par:

Sylvie Marleau, directrice de recherche

Fahima Nekka, présidente du jury

Diala Harb, membre du jury

## Résumé

L'athérosclérose est caractérisée par l'accumulation de lipoprotéines de basse densité (LDL) liées aux protéoglycanes de la paroi artérielle. Des anticorps chimériques (ch) qui se lient aux glycosaminoglycanes (GAG) ont été générés. L'hypothèse est que la vaccination avec le chP3R99, un anticorps chimérique mutant de l'hybridome P3, pouvait interférer avec la rétention des LDL par l'induction d'une cascade d'anticorps anti-idiotypiques dirigés contre les GAG.

Des souris mâles déficientes en apolipoprotéine E ont été soumises à une diète hypercholestérolémique et ont reçu 5 injections sous-cutanées de 50 µg de vaccin chP3R99 ou de vaccin chP3S98 (un mutant de faible réactivité). Les injections ont été effectuées à chaque semaine ou aux 2 semaines. Au moment du sacrifice, l'aorte perfusée avec du PBS a été excisée et analysée après coloration au Oil Red-O. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de lésions sur la superficie totale de l'aorte. La réactivité contre le chP3R99, chP3S98, l'héparine, le sulfate de dermatane et de chondroïtine des sérums de souris immunisées a été mesurée par ELISA. De plus, la liaison de l'anticorps chP3R99 aux GAG dans la lésion d'athérosclérose a été observée par un appareil de visualisation *in vivo*.

Nos résultats montrent que l'immunogénicité des anticorps chP3R99 est supérieure à celle des anticorps chP3S98 et que le sérum des souris immunisées avec le chP3R99 présente des anticorps anti-idiotypiques dirigés contre les GAG. Cet effet est associé à une réduction de 42 % ( $p < 0.01$ ) du pourcentage de lésions athérosclérotiques chez les souris vaccinées.

L'utilisation d'une immunisation active avec l'anticorps chP3R99 pourrait constituer une approche thérapeutique pour le traitement de l'athérosclérose.

**Mots-clés** : Vaccin, anticorps, chP3R99 , athérosclérose, cascade anti-idiotypique, glycosaminoglycane, souris déficientes en apolipoprotéine E.

## Abstract

Atherosclerosis is characterized by the accumulation of low density lipoprotein (LDL) associated with the proteoglycans of the arterial wall. Chimeric (ch) antibodies that react against glycosaminoglycans (GAG) were generated. We tested the hypothesis that vaccination with chP3R99, a mutant chimeric antibody of the P3 hybridoma, could interfere with the retention of LDL by inducing a cascade of anti-idiotypic antibodies directed against the GAG.

Male mice deficient in apolipoprotein E fed with a hypercholesterolemic diet were given five subcutaneous injections of 50  $\mu$ g of chP3R99 or chP3S98 (a mutant with low reactivity) vaccine. The injections were performed every week or every two weeks. After sacrifice, the aorta was perfused with PBS, excised and analyzed after staining with Oil Red-O. The results were expressed as a percentage of lesions areas on the total area of the aorta. The reactivity of the sera obtained was tested against the chP3R99, chP3S98, heparin, dermatan and chondroitin sulfate from obtained immunized mice by ELISA. The anti-idiotypic response was measured by blocking the anti-isotypic reactivity by a nonspecific IgG, hR3. In addition, the antibody chP3R99 binding to GAG in the atherosclerotic lesion was shown by an *in vivo* molecular imaging device.

Our results show that the immunogenicity of the antibodies chP3R99 is higher than chP3S98 and that sera from mice immunized with chP3R99 present anti-idiotypic antibodies directed against the GAG. This effect is associated with a 42 % reduction ( $p < 0.01$ ) of atherosclerotic lesions in vaccinated mice.

The use of active immunization with antibodies chP3R99 may constitute a new therapeutic approach for the treatment of atherosclerosis.

**Keywords** : Vaccine, antibody, chP3R99 , atherosclerosis, anti-idiotypic cascade, glycosaminoglycan, apolipoprotein E knockout mouse.

# Table des matières

I.	INTRODUCTION.....	1
1.	Épidémiologie .....	2
2.	Les facteurs de risques .....	2
3.	Étapes du développement de l'athérosclérose .....	5
4.	Perméabilité de la paroi artérielle.....	6
5.	Interaction entre les lipoprotéines et les protéoglycanes.....	9
6.	Stress oxydatif .....	11
7.	L'internalisation des LDLox par les macrophages .....	15
8.	Remodelage de la matrice extracellulaire et rôle des cytokines.....	18
9.	Stabilité de la plaque .....	24
10.	Traitements anti-athérosclérotiques .....	25
10.1.	Statines .....	25
10.2.	Fibrates .....	26
10.3.	Mimétiques apoA-I .....	26
10.4.	Trapibes .....	27
10.5.	La vaccination .....	27
10.5.1.	Vaccins contre l'athérosclérose .....	28
10.5.2.	Vaccins contre l'influenza .....	29
10.5.3.	Vaccins contre les LDLox.....	30
10.5.4.	Vaccin contre l'apoB .....	31
11.	Hypothèse de recherche .....	31

12.	Objectifs de recherche .....	35
II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	36
1.	Protocole expérimental.....	37
2.	Analyse morphométrique .....	39
3.	Dosage des sérums des souris immunisées contre le chP3R99 ou GAG par ELISA.....	40
4.	Imagerie optique in vivo avec l'appareil Optix MX3.....	41
5.	Immunohistochimie.....	42
6.	L'analyse des lipides sériques dans le sérum.....	43
7.	Analyse statistique.....	43
III.	RÉSULTATS .....	44
1.	Analyse morphométrique .....	45
2.	Dosage du cholestérol et des lipides sériques .....	47
3.	La réactivité du sérum contre le chP3R99 .....	48
4.	Dominance des anticorps anti-idiotypiques .....	49
5.	La réactivité du sérum envers les glycosaminoglycanes.....	51
6.	Visualisation in vivo du VCAM-1 et du site de liaison de chP3R99.....	53
7.	Liaison du chP3R99 dans les lésions d'athérosclérose.....	54
8.	Élimination du chP3R99-FITC de l'organisme .....	55
9.	Caractérisation des différentes populations de macrophages dans les lésions d'athérosclérose .....	56
IV.	DISCUSSION .....	60
1.	La vaccination avec le chP3R99 réduit la taille des lésions d'athérosclérose ..	63



2.	L'anticorps chP3R99 est capable de se lier au niveau des lésions in vivo .....	68
V.	PERSPECTIVES.....	71
VI.	CONCLUSION .....	74
VII.	SOURCES DOCUMENTAIRES.....	76

## **Tableau**

Tableau I. Facteurs de risque pour le développement de l'athérosclérose .....	3
---	---

## Liste des figures

Figure 1	Illustration de la structure d'un protéoglycane composé de ses chaînes de glycosaminoglycans et une lipoprotéine de basse densité.....	10
Figure 2	Illustration de LDL retenues par les protéoglycans photographiées par un microscope électronique.....	11
Figure 3	Production de $O_2^-$ après le découplage de eNOS.....	13
Figure 4	Les cytokines impliquées dans l'athérosclérose .....	23
Figure 5	Représentation de la cascade d'anticorps anti-idiotypiques générée par le vaccin chP3R99.....	34
Figure 6	Le protocole d'administration du vaccin .....	39
Figure 7	Effets anti-athérosclérotiques du EP 80317 et du chP3R99 par comparaison au groupe témoin ayant reçu du PBS .....	45
Figure 8	Pourcentage de réduction des lésions athérosclérotiques.....	46
Figure 9	.....	48
Figure 10	.....	49
Figure 11	Dominance des anticorps anti-idiotypiques dans le sérum des souris immunisées avec le chP3R99.....	50
Figure 12	La réactivité du sérum des souris immunisées avec du chP3R99 ou du chP3S98 envers les glycosaminoglycans .....	52
Figure 13	Visualisation <i>in vivo</i> de la localisation du VCAM-I et des sites de liaison de l'anticorps chP3R99.....	54

Figure 14	Augmentation de la liaison du chP3R99 chez les souris ayant davantage de lésions d'athérosclérose .....	55
Figure 15	Cinétique du chP3R99-FITC après son injection intraveineuse .....	56
Figure 16	Caractérisation des différentes populations de macrophages dans les lésions d'athérosclérose .....	59

## Liste des abréviations

AC, Anticorps

AC2, AC3 Anticorps de deuxième et de troisième génération

ANGPTL3, *Angiopoietin-like 3*

ApoA, Apolipoprotéine A

ApoA1, Apolipoprotéine A1

ApoA2, Apolipoprotéine A2

ApoA5, Apolipoprotéine A5

ApoB, Apolipoprotéine B

ApoC3, Apolipoprotéine C3

ApoE, Apolipoprotéine E

ApoE<sup>-/-</sup>, Souris homozygote déficiente en apolipoprotéine E

ARN, Acide ribonucléique

ARNm, Acide ribonucléique messenger

BSA, Albumine sérique bovine

CCL2, Chemokine ligand 2 (MCP-1)

CCL5, Chemotactic ligand 5 (RANTES)

CD36, Cluster of differentiation 36

CETP, La protéine de transfert des esters de cholestérol

DAB, Diaminobenzidine

Partie Fc, Partie constante de l'anticorps

eNOS, Oxyde nitrique synthétase endothéliale

ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay

FITC, Isothiocyanate de fluorescéine

GAG, Glycosaminoglycane

GM-CSF, Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

HBS, Tampon hépès salin

HDL, Lipoprotéines de haute densité

HMG CoA réductase, Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase

HRP, Peroxydase de raifort

I<sup>125</sup>, Iode-125

ICAM-1, Molécule d'adhérence intercellulaire

IFN, Interféron

iNOS, Oxyde nitrique synthétase inductible

IL, Interleukine

IRF3, Facteur 3 de régulation de l'interféron

JNK, Jun N-terminal kinases

LDL, Lipoprotéine de basse densité

LDLox, Lipoprotéine de basse densité oxydée

LOX, Lipoxygénase

LPL, Lipoprotéine lipase

Lymphocytes NKT, Lymphocytes T natural killer

Lymphocytes Th1, Lymphocytes T helper 1

Lymphocytes Th2, Lymphocytes T helper 2

MAC, Macrophages

MCP-1, Protéine chimiotactique des macrophages

M-CSF, Facteur de stimulation des colonies de macrophages

MIF, Facteur d'inhibition de la migration des macrophages

MPO, Myéloperoxydase

MYD88, *Myeloid differentiation primary response gene (88)*

NC, Compte normalisé

NeuGc, Gangliosides-N-glycolylés

NF $\kappa$ b, Facteur nucléaire-kappa B

nNOS, Oxyde nitrique synthétase neuronale

NO, Oxyde nitrique

NOS, Oxyde nitrique synthétase

O<sub>2</sub><sup>-</sup>, anion superoxyde

PBS, Tampon phosphate salin

PCSK9, Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9

PPAR, récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes

SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, Ion sulfate

SRA, Récepteur éboueur de classe A

TF, Facteur tissulaire

TLR, Récepteur de type Toll

TMB, 3,3', 5,5'-Tétraméthylbenzidine

TNF- $\alpha$ , Facteur de nécrose tumorale- $\alpha$

VCAM-1, Molécule d'adhérence vasculaire-1

VLDL, Lipoprotéine de très basse densité

*Je dédie mon mémoire à ma mère, mon  
père et à ma sœur cadette, Aryel*

*« Le génie est une longue patience »*

*Buffon*



## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma directrice, Docteure Sylvie Marleau, dont la grande disponibilité n'a d'égale que son enthousiasme. Chaque réunion était pour moi un encouragement renouvelé; j'en suis toujours ressorti orienté. Son savoir, ses réflexions et ses commentaires m'ont beaucoup aidé dans ma progression. Je remercie également Dr. Ong qui a contribué à nos discussions, pour sa rigueur et son approche pédagogique. De même, je désire remercier ma famille, mes amis et mes collègues de laboratoire, sans qui cette épopée aurait probablement plus tenu de la traversée du désert. J'aimerais souligner l'apport plus particulier de Katia, David, Liliane, Dilan, Cindy, Pétra, Kim, Christian et Patrick. Par les échanges que nous avons eus, vos commentaires, conseils et corrections et, de façon générale, votre joyeuse compagnie, vous m'avez grandement facilité la tâche et avez contribué à la rendre plus agréable. J'ai aussi pu compter sur l'appui de la docteure Ana-María Vázquez du Centre d'immunologie moléculaire de La Havane qui m'a toujours appuyé et aidé pendant la réalisation ce projet. J'ai travaillé avec ses étudiants, provenant de Cuba, Victor et Ariadna et notre collaboration a été des plus enrichissantes, tant au plan intellectuel qu'humain. La réussite de ce projet témoigne du rayonnement international de ma maîtrise.

## **I. INTRODUCTION**

## 1. Épidémiologie

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire de la paroi des artères qui est responsable de plusieurs maladies cardiovasculaires, telle que la cardiopathie ischémique. Dans les pays industrialisés, les maladies cardiovasculaires constituent la principale cause de mortalité. En 2007, 800 000 personnes sont mortes de maladies cardiovasculaires aux États-Unis (Lloyd-Jones *et al.*, 2010). La même année, 16 251 000 visites médicales ont eu lieu en raison de cette maladie et la majorité de ces visites (62 %) étaient liées à un suivi pour l'athérosclérose coronarienne. On estime que l'athérosclérose coronarienne est responsable de 1,2 million d'hospitalisations dont les traitements coûtent 44 milliards de dollars à chaque année aux États-Unis. Plus de la moitié de ces patients ont dû recevoir une revascularisation cardiaque (Hansson *et al.*, 2006). Les maladies cardiovasculaires sont également un problème de santé majeur pour la population québécoise, où en 2008 plus de 14 800 personnes en sont mortes, ce qui représente 26 % de toutes les causes de mortalité. La même année au Québec, 8 000 personnes seraient mortes de cardiopathie ischémique et 4 000 personnes d'infarctus du myocarde (Institut de la statistique du Québec, 2011).

## 2. Les facteurs de risques

De plus, on prévoit qu'avec l'augmentation des facteurs de risque comme l'obésité et le diabète (Tableau I), l'athérosclérose risque d'augmenter dans la population mondiale (Hansson *et al.*, 2006). Il a été estimé qu'il y aurait une augmentation de la mortalité

reliée aux maladies cardiovasculaires de 90% en 2020 par rapport à 1990 (Yusuf *et al.*, 2001). Chez les Américains, il a été évalué par l'American Heart Association que 33,8 % des adultes présentent un surplus de masse corporelle, 31,7 % des adultes ne font pas suffisamment d'activité physique, 17,1 % des adultes souffrent d'hypertension et 76,8 % ont une mauvaise alimentation pour leur santé cardiovasculaire (Lloyd-Jones *et al.*, 2010).

Tableau I. Facteurs de risque pour le développement de l'athérosclérose

<u>Facteurs génétiques</u>	<u>Facteurs environnementaux</u>
Taux élevé de LDL et VLDL	Tabagisme
Taux bas de HDL	Diète Calorique
Hypertension	Peu d'exercice physique
Diabète	Infection d'agents pathogènes
Sexe masculin	
Obésité	
Histoire familiales	

Ce tableau est tiré et traduit de l'article (Glass & Witztum, 2001)

Outre ces facteurs de risque, l'âge constitue l'un des risques les plus importants pour les maladies cardiovasculaires puisque ces maladies se développent sur des périodes supérieures à 10 ans. Par exemple, un homme aux États-Unis qui est âgé entre 30 et 34 ans a 3 % de chance d'avoir un problème cardiovasculaire, tandis que ce risque augmente à 21 % lorsqu'il aura atteint 60 ans (Wilson *et al.*, 1998). Un facteur de

risque commun chez la population vieillissante est l'hypercholestérolémie où la présence de «mauvais» cholestérol (lipoprotéines de basse densité ou LDL) se voit en quantité élevée par rapport au «bon» cholestérol (lipoprotéine de haute densité HDL). Des études épidémiologiques ont montré que le risque de développer l'athérosclérose des artères coronariennes est augmenté avec des niveaux de LDL élevés dans le plasma, tandis que la présence de concentrations élevées de HDL dans le plasma en diminue le risque (Kannel *et al.*, 1971) (Miller & Miller, 1975).

De plus, le risque de développer des maladies cardiovasculaires est plus élevé chez les hommes que chez les femmes, (Barrett-Connor & Bush, 1991) ayant conduit à l'hypothèse selon laquelle l'estrogène a un effet protecteur chez les femmes (Barrett-Connor, 2009). Cependant, cette hypothèse est controversée par le fait que le traitement avec l'estrogène chez des femmes en préménopause n'a pas réduit le risque des maladies cardiovasculaires chez ces dernières (Hulley *et al.*, 1998). La diminution du risque chez les femmes ménopausées pourrait être la conséquence des concentrations plasmatiques de HDL plus élevées chez les femmes que chez les hommes du même âge (Stocker & Keaney, Jr., 2004a).

Aux États-Unis, 6,2 % de la population, soit 17 millions de citoyens souffrent de diabète de type 2 (Cowie *et al.*, 2006) alors qu'au Québec, 278 900 personnes présentent ce type de diabète (Institut national de la santé publique du Québec, 2003).

Le diabète de type 2 augmente le risque de développer des maladies cardiovasculaires de trois à cinq fois (Bierman, 1992).

Enfin, le tabagisme accroît le risque de développer une maladie cardiovasculaire (English JP *et al.*, 1940.). Aux États-Unis, les maladies cardiovasculaires causées par la cigarette seraient responsables de 400 000 décès par année (Prochaska & Hilton, 2012). En effet, la fumée de cigarette augmente le stress oxydatif et favorise par le fait même l'oxydation des LDL, une des phases clés de l'athérosclérose (Stocker & Keaney, Jr., 2004b).

### 3. Étapes du développement de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique de la paroi des artères caractérisée par l'accumulation de macrophages spumeux. Ce processus commence par l'infiltration des LDL dans la paroi vasculaire artérielle. La perméabilité de la paroi est donc un facteur initial de la maladie. Les LDL qui infiltrent la paroi vont par la suite être retenues dans l'intima via des liaisons entre l'apoB et les glycosaminoglycanes (GAG). Les LDL retenues seront soumises à des modifications oxydatives causées par diverses enzymes présentes dans l'intima. La formation des stries lipidiques dans la lésion débute par l'accumulation de macrophages qui internalisent les LDL oxydées (LDLox) via leur récepteurs éboueurs (*scavengers*) (Febbraio *et al.*, 2000a). Les macrophages qui internalisent les LDLox deviennent activés et relâchent des cytokines pro-inflammatoires. La lésion progresse par le développement d'une plaque fibreuse

caractérisée par la prolifération de cellules musculaires lisses. La lésion d'athérosclérose peut, pendant plusieurs années, ne montrer aucun symptôme apparent pour le patient tant que le flux sanguin n'est pas perturbé. Cependant, les symptômes de la maladie apparaissent si la lésion obstrue la lumière de l'artère. De plus, les macrophages qui internalisent les LDL peuvent mourir par apoptose; dans les lésions avancées, la mort de ces cellules crée des corps nécrotiques qui participent à entretenir l'environnement inflammatoire (Tabas, 2005). S'il y a une rupture de la plaque, il peut y avoir la formation de thrombose ou d'une embolie qui peut compromettre l'arrivée d'oxygène à des organes importants tels que le cœur ou le cerveau. Il survient alors des complications médicales tels qu'un l'infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral (Steinberg & Witztum, 2002).

#### 4. Perméabilité de la paroi artérielle

L'accumulation des LDL dans la paroi artérielle est un événement fondamental pour le développement de l'athérosclérose et une haute concentration de LDL dans le plasma favorise le développement des lésions d'athérosclérose (Stary *et al.*, 1994). On estime que la perméabilité normale de la paroi artérielle aux LDL varie entre 5 et 100 nl/h, ce qui est beaucoup moins grand que la perméabilité de la paroi à l'eau qui est de 11 000 nl/h, ce qui pourrait laisser croire que l'endothélium de la paroi artérielle forme une barrière pour les particules d'environ 25 nm telles que les lipoprotéines de basse densité (Bratzler *et al.*, 1977). De plus, l'infiltration des LDL est indépendante des récepteurs aux LDL des cellules endothéliales. En effet, la perméabilité de la paroi aux

LDL n'est pas modifiée même si on sature les récepteurs aux LDL après une augmentation de la concentration en LDL dans le plasma (Bratzler *et al.*, 1977). Chez des lapins, la méthylation de l'apoprotéine B des LDL, qui empêche la liaison avec le récepteur aux LDL, n'a pas modifié la perméabilité de la paroi artérielle aux LDL (Wiklund *et al.*, 1985).

Il existe deux hypothèses pour expliquer le mécanisme de l'entrée des LDL dans l'intima :

- 1) Le transport des LDL se fait par des vésicules à travers les cellules endothéliales (transcytose). Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'après l'injection de LDL marquées avec I<sup>125</sup> (Iode<sup>125</sup>) chez des lapins, le radiotracteur a été retrouvé principalement dans des vésicules de cellules endothéliales (Stein *et al.*, 1973).
- 2) Le transport de LDL se fait principalement via les jonctions interendothéliales. Il a été suggéré que les espaces dans lesquelles les cellules endothéliales meurent ou sont en division, offrent un passage pour les LDL (Weinbaum *et al.*, 1985). À l'appui, des études ultrastructurales ont détecté des jonctions ouvertes de 25 à 300 nm entre les cellules endothéliales d'aortes de rat (Kao *et al.*, 1994).

L'entrée de LDL dans l'intima par la paroi est essentielle pour le développement de la lésion d'athérosclérose. Parmi les principaux facteurs qui influencent la perméabilité de la paroi, notons la concentration des LDL. Chez les foetus, on a découvert qu'il était



courant d'observer des stries lipidiques (Napoli *et al.*, 1997). De plus, si la mère souffre d'hypercholestérolémie, la formation de lésions est favorisée chez son enfant (Napoli *et al.*, 1997). Heureusement, il peut y avoir une régression des lésions pendant la fin de la gestation ou pendant la petite enfance lorsque le niveau de LDL est bas (Napoli *et al.*, 1999).

La haute pression sanguine augmente l'entrée des LDL dans la paroi. Chez des lapins, la perfusion continue d'angiotensine II et de noradrénaline augmente la tension artérielle et il en résulte en une augmentation de l'entrée des LDL dans la paroi artérielle (Nielsen *et al.*, 1994). Le même phénomène a été observé chez des aortes isolées de lapin; l'influx des LDL à travers la paroi est augmenté lorsqu'on augmente la pression (Curmi *et al.*, 1990).

La concentration des LDL dans le plasma ainsi que la pression sanguine sont deux facteurs qui favorisent l'augmentation de la perméabilité, mais d'autres mécanismes sont aussi impliqués pour expliquer l'augmentation de la perméabilité lorsqu'il y a présence d'une lésion d'athérosclérose dans la paroi. Il a d'ailleurs été démontré que la perméabilité aux LDL est 6 fois plus élevée chez des aortes de singe ayant de l'athérosclérose que chez des aortes de singes n'ayant pas d'athérosclérose (Portman *et al.*, 1987). Les mécanismes qui expliquent ce phénomène ne sont pas complètement compris. Une des hypothèses suggère que puisque la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) est diminuée dans l'endothélium sous-jacent à une lésion d'athérosclérose, la

relaxation de l'artère est diminuée, ce qui augmente la pression sanguine (Cooke & Tsao, 1994). Une autre hypothèse pour expliquer l'augmentation de la perméabilité de la paroi artérielle est l'entrée simultanée des LDL aux sites de pénétration des leucocytes dans les couches de l'endothélium pendant la migration des monocytes vers la lésion (Territo *et al.*, 1984).

## 5. Interaction entre les lipoprotéines et les protéoglycanes

Bien que la perméabilité des veines, des valves aortiques et des artères pulmonaires soit bien plus élevée que celle de l'aorte, les lésions d'athérosclérose se développent rarement dans ces endroits. Les artères qui sont les plus susceptibles de développer des lésions sont celles qui sont capables de faire la rétention des LDL dans l'intima (Schwenke & Carew, 1989a).

La matrice sous-endothéliale est composée de protéoglycanes, de collagène, de fibronectine et de vitronectine (Khalil *et al.*, 2004). Les protéoglycanes sont les molécules responsables de la rétention des LDL dans la paroi vasculaire. Les protéoglycanes sont de grandes protéines auxquelles plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) sont attachées. Les GAG sont des chaînes de polysaccharides sulfatés qui diffèrent par le degré de sulfatation des différents groupes de sucre.

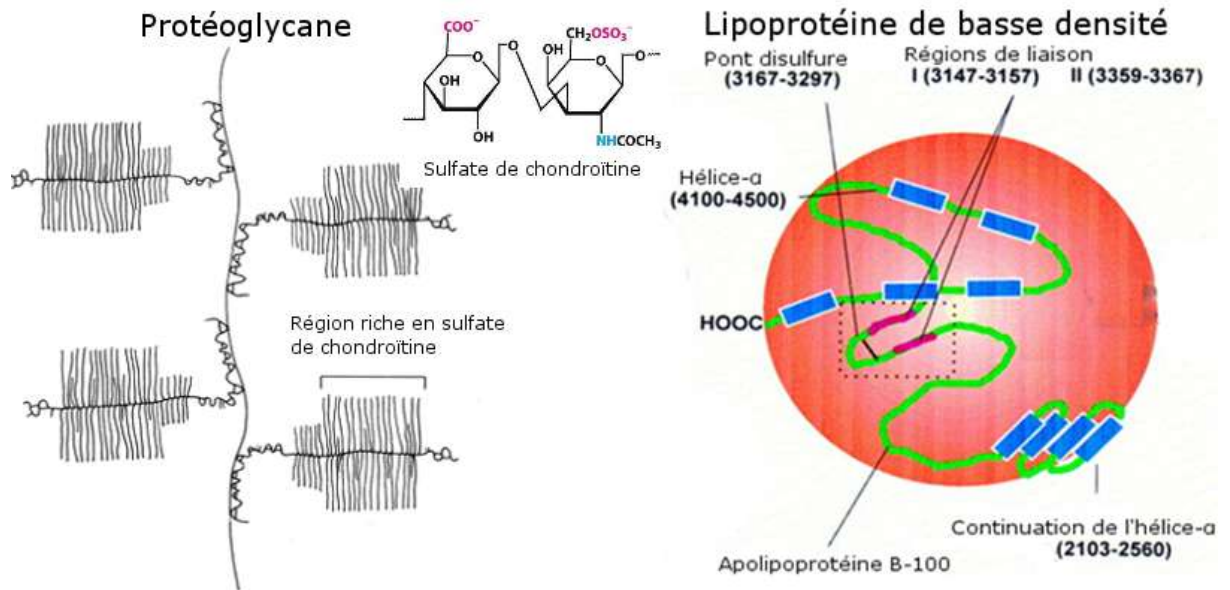


Figure 1. Illustration de la structure d'un protéoglycane composé de ses chaînes de glycosaminoglycanes et une lipoprotéine de basse densité. Les régions de liaison de l'apolipoprotéine B-100 et la structure du sulfate de chondroïtine. (Camejo et al., 1998) (Kairemo et al., 2001)

La rétention des LDL dans la matrice extracellulaire de l'intima est causée par une liaison entre les GAG et les LDL. Cette liaison de nature ionique se produit entre les groupements sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) et carboxylique ( $\text{COO}^-$ ) des protéoglycanes chargés négativement, et les charges positives des lysines et des arginines de l'apoB (Tannock & King, 2008). Les régions de liaison sur l'apoB-100 sont au niveau des acides aminés 3147-3157 (SVKAQYKKNKHKH) et 3359-3367 (RLTRKRGLK) (Hurt-Camejo *et al.*, 1997; Boren *et al.*, 1998). C'est deux régions sont séparées par 202 acides aminés, mais ces deux régions sont rapprochées par un pont disulfure par la cystéine (3167) et la cystéine (3297) (Chan, 1992). Les protéoglycanes, qui contiennent des chaînes de sulfate de chondroïtine, sont celles qui possèdent le plus d'affinité envers les LDL et contribuent le plus au développement de la maladie (Williams, 2001). D'ailleurs, des

souris qui possèdent une mutation du site de liaison du sulfate de chondroïtine pour le LDL, présentent une diminution des lésions de l'athérosclérose (Skalen *et al.*, 2002). De plus, plusieurs enzymes dans la matrice extracellulaire favorisent la liaison des LDL aux GAG, telles que la lipoprotéine lipase et la sphingomyélinase. L'association des LDL aux GAG serait augmentée de 50 à 100 fois lorsqu'il y a présence de ces deux enzymes. Malencontreusement, leur synthèse est augmentée par les macrophages dans les lésions d'athérosclérose (Tabas *et al.*, 1993).

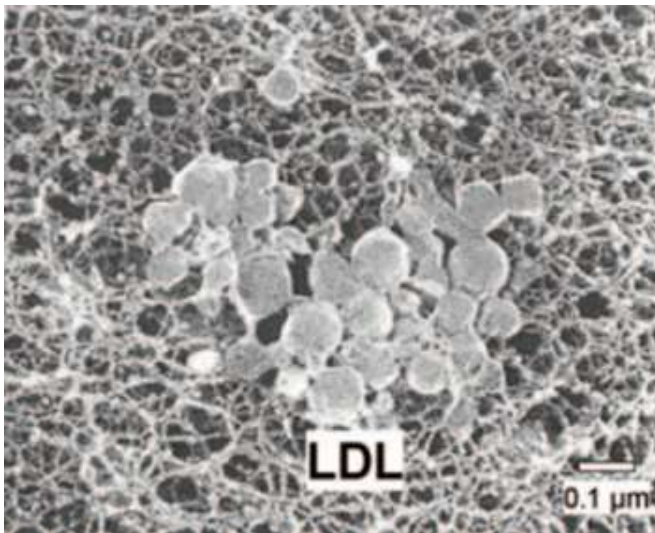


Figure 2. Illustration de LDL retenues par les protéoglycanes photographiées par un microscope électronique. (Wyler von *et al.*, 2006).

## 6. Stress oxydatif

Par la suite, la rétention des LDL dans l'intima de la paroi va entraîner l'oxydation des LDL. Lorsque les LDL sont maintenues dans la matrice extracellulaire, elles

deviennent des cibles pour des réactions oxydatives et des modifications enzymatiques. La liaison aux GAG augmente la période de temps où les LDL sont exposées à des conditions pro-oxydatives, ce qui favorise leur oxydation. Une fois oxydées, les LDL enclenchent un processus inflammatoire dans la paroi vasculaire. Les LDLox relâchent des produits métaboliques dont les phospholipides oxydés qui activent les cellules endothéliales à exprimer des molécules d'adhérence (VCAM-1) et des chimiokines telles que CCL-2 (MCP-1) et CCL-5 (RANTES), lesquelles contribuent à la migration sous-endothéliale des leucocytes, en particulier des monocytes sanguins qui vont maturer en macrophages (Hansson, 2009).

Il existe plusieurs enzymes ou réactions oxydatives qui sont responsables de cette oxydation. La myéloperoxydase (MPO), une enzyme des granules azurophiles des neutrophiles et des monocytes, possède un important rôle antibactérien. Son activité microbicide provient de son habilité à produire des agents oxydants tel que l'acide hypochloreux. Cette enzyme a été retrouvée dans les plaques d'athérosclérose et elle participe à l'oxydation des LDL (Daugherty et al., 1994). Le NO est une molécule produite par trois différentes isoformes de synthétases de l'oxyde nitrique (NOS): la forme endothéliale (eNOS), neuronale NOS (nNOS) et inductible (iNOS).

La production d'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) en situation physiologique normale est contrebalancée par des mécanismes anti-radicaux libres tels que les enzymes superoxyde dismutase, glutathione peroxydase et catalase. Par contre, dans une

condition pathologique ces mécanismes de défense ne suffisent plus, il s'ensuit alors un état de stress oxydatif. Les enzymes NOS contribuent à la production du  $O_2^-$  et participent au stress oxydatif. Lorsqu'il y a une diminution du cofacteur  $BH_4$ , cela entraîne un découplage de l'enzyme NOS qui inhibe la production de NO, de L-citrulline, et augmente la synthèse de  $O_2^-$  et de  $H_2O_2$  (Katusic, 2001).

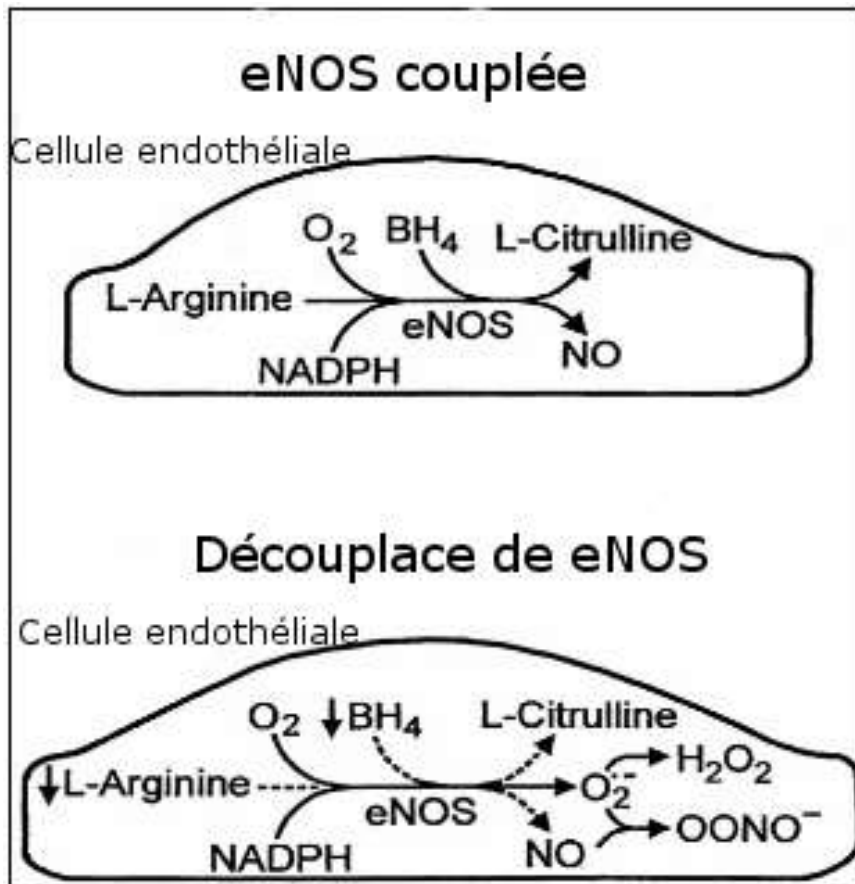


Figure 3. Production de  $O_2^-$  après le découplage de eNOS (Katusic, 2001)

Enfin, plusieurs études épidémiologiques et cliniques appuient l'hypothèse selon laquelle l'homocystéine et  $O_2^-$  sont des facteurs de risque pour l'athérosclérose (Welch & Loscalzo, 1998). De plus, plusieurs études ont montré que les muscles lisses et les

monocytes synthétisent l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et le sécrètent à l'extérieur de la cellule, où ce composé réactif de l'oxygène peut oxyder les LDL (Cathcart et al., 1989). Les lipoxygénases (LOX) seraient aussi impliquées dans l'oxydation des LDL. Les LOX sont des enzymes intracellulaires qui catalysent la peroxydation des acides gras polyinsaturés. En particulier, une augmentation de l'ARNm de la 15-LOX est observée dans les plaques d'athérosclérose (Yla-Herttuala et al., 1991). L'oxydation des LDL peut aussi être causée par les ions métalliques. Ces ions peuvent provoquer l'oxydation des protéines et des lipides. Leur présence a été trouvée dans les plaques d'athérosclérose humaines (Lamb et al., 1995).

L'oxydation des LDL étant importante pour le développement de l'athérosclérose, l'effet vasculo-protecteur des produits antioxydants a donc été étudié dans cette maladie. Certaines études ont montré que les antioxydants tels que le  $\alpha$ -tocophérol et le butylhydroxytoluène peuvent inhiber complètement l'oxydation des LDL (Steinbrecher et al., 1984). Une étude avec le probucol, un antioxydant, produit une réduction de 48% des lésions d'athérosclérose chez des lapins de 20 mois (Carew et al., 1987).

La concentration de vitamine E dans le plasma est un des facteurs qui diminue l'incidence des maladies cardiovasculaires et l'ajout de vitamine E dans l'alimentation réduit le développement des lésions dans les artères coronaires (Rimm et al., 1993) (Nunes et al., 1997). Cependant, le rôle protecteur des antioxydants demeure

controversé. Certains antioxydants, tel que la bêta-carotène, n'aurait pas d'effet sur la progression de l'athérosclérose (Reaven et al., 1993).

## 7. L'internalisation des LDLox par les macrophages

L'oxydation des LDL est une étape cruciale pour le développement de l'athérosclérose. Les récepteurs CD36, CD68 et SRA sont les principaux récepteurs éboueurs identifiés pour l'internalisation des LDLox (Krieger, 1997). La formation de cellules spumeuses n'est alors pas régulée par les récepteurs de LDL (Goldstein & Brown, 1977) mais plutôt par les récepteurs éboueurs des macrophages qui reconnaissent la forme oxydée des LDL. Les récepteurs de LDL chez les macrophages présentent une modulation négative de leur expression due à l'environnement riche en LDL dans les lésions d'athérosclérose (Fogelman *et al.*, 1981). Les cellules spumeuses (*foam cells*) à l'origine de la maladie proviennent du fait que les macrophages internalisent les LDLox et accumulent le cholestérol (Hansson, 2009). L'accumulation des lipides dans les macrophages s'explique par leur incapacité à dégrader les LDLox rapidement. Les LDLox pourraient interagir avec les endosomes et les lysosomes et modifier la vitesse de dégradation (Sparrow *et al.*, 1989). Il a été découvert que les récepteurs à mannose, nécessaires pour le transport vers les lysosomes, sont sensibles à l'oxydation ce qui affecte leur fonctionnement (Bozeman *et al.*, 1988).

Les récepteurs éboueurs permettent l'internalisation du LDLox. Les macrophages provenant de souris déficientes en récepteurs CD36 présentent une diminution dans



l'internalisation des LDLox (Nozaki *et al.*, 1995) et une réduction des lésions d'athérosclérose (Febbraio *et al.*, 2000b). Une des explications possibles de cette inflammation vasculaire associée à l'accumulation des LDLox est que ses phospholipides oxydés ressemblent à des molécules pathogènes (de Boer *et al.*, 2000). Outre les macrophages, les lymphocytes T provenant des plaques d'athérosclérose sont activés par la bactérie *Chlamydia pneumoniae* (de Boer *et al.*, 2000). Il est observé que la vaccination contre la bactérie *Streptococcus pneumoniae* réduit l'athérosclérose chez les souris déficiente en apolipoprotéine E (apoE<sup>-/-</sup>). En effet, les anticorps seraient possiblement capables de se lier aux phospholipides oxydés des LDLox et d'empêcher leur reconnaissance par les récepteurs éboueurs des macrophages (Binder *et al.*, 2003). Plusieurs rapports ont montré la corrélation entre l'incidence de l'athérosclérose et la présence d'au moins un des deux types d'infection à un microorganisme: le virus de l'herpès et la bactérie *Chlamydia Pneumoniae*. L'infection par ces microorganismes induit une inflammation de la paroi artérielle, ce qui favorise la formation des lésions d'athérosclérose (Libby *et al.*, 1997).

Les souris déficientes en récepteurs éboueurs tels que le CD36 et SRA présentent une diminution de la formation des cellules spumeuses. Par contre, même en l'absence de ces récepteurs, il y a quand même formation de cellules spumeuses (Manning-Tobin *et al.*, 2009). Cette observation suppose l'existence d'autres mécanismes qui contribuent à l'internalisation des LDL. Une hypothèse étudiée pour expliquer l'internalisation des LDL malgré l'absence des récepteurs éboueurs est la pinocytose (Kruth *et al.*, 2005).

La pinocytose est un mécanisme dynamique lié au cytosquelette de la cellule dont la polymérisation de l'actine entraîne la formation d'un pseudopode de la cellule. La dépolymérisation de l'actine permet à ce pseudopode de fusionner avec la membrane, ce qui crée la formation d'une vacuole dont le contenu provient du milieu extracellulaire. La pinocytose est un mécanisme cellulaire qui est indépendant des récepteurs et qui forme de grandes vacuoles ( $> 0,5 \mu\text{m}$ ) appelées macropinocytoses ou de petites vacuoles ( $\leq 0,2 \mu\text{m}$ ) appelées micropinocytoses (Daugherty *et al.*, 1994). L'internalisation de LDL-I<sup>125</sup> a été mesurée chez des macrophages déficients en récepteurs des LDL et la microscopie électronique a mis en évidence les LDL dans les vacuoles provenant de la pinocytose (Anzinger *et al.*, 2010). Ceci suggère que les LDL n'ont pas besoin d'être oxydées pour être internalisées. Ainsi, l'entrée du cholestérol dans les macrophages est alors à la fois causée par l'entrée des LDLox par endocytose et l'entrée des LDL non oxydées par pinocytose. Par contre, la pinocytose est un mécanisme moins athérogénique puisqu'il a été démontré que ce processus n'enclenche pas la production de cytokines pro-inflammatoires (Anzinger *et al.*, 2012). Au contraire, l'activation des récepteurs éboueurs favorise la production de cytokines, puisque les macrophages déficients en récepteurs éboueurs voient leur capacité à sécréter plusieurs cytokines dont IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-12, l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), le *macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ ), et le *macrophage inflammatory protein-2* (MIP-2), réduite d'environ 50% (Kuchibhotla *et al.*, 2008). L'activation des récepteurs éboueurs est associée avec le

processus d'apoptose des macrophages qui est responsable de l'accumulation de corps nécrotiques dans la lésion, ce qui favorise son instabilité parce qu'ils sont une source de protéases telles que l'urokinase et les métalloprotéinases (Schwartz *et al.*, 2007). L'activation du récepteur éboueur de classe A (SRA) conduit à l'apoptose en activant le *Toll like receptor 4* (TLR4). Le TLR4 active une voie pro-apoptotique de *Jun N-terminal kinase* (JNK) et de *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MYD88). En plus, l'activation de SRA bloque la transcription du facteur 3 de régulation de l'interféron (IRF3) et diminue la production d'interféron- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), ce qui empêche l'activation de la voie de survie d'IFN- $\beta$ , opposée à la voie apoptotique de la voie JNK (Seimon *et al.*, 2006).

## 8. Remodelage de la matrice extracellulaire et rôle des cytokines

Tel indiqué précédemment, l'inflammation de la paroi artérielle commence par l'accumulation des LDLox et leur internalisation par les macrophages. Les LDLox présentent des phospholipides pro-inflammatoires qui activent les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Kume *et al.*, 1992). Une fois les cellules endothéliales activées, elles vont exprimer plusieurs molécules d'adhérence pour les leucocytes sanguins.

La première barrière entre le sang et l'intima est formée par les cellules endothéliales. Les leucocytes de la circulation sanguine doivent utiliser la diapédèse pour s'introduire

entre les jonctions des cellules endothéliales en vue de migrer vers les tissus. Cependant, pour effectuer la diapédèse, les leucocytes doivent d'abord réussir à s'immobiliser sur l'endothélium malgré le flux sanguin situé au niveau de la lésion. La migration des leucocytes débute par l'adhésion des sélectines-L, exprimées par les leucocytes, aux sialomucines sur les cellules endothéliales. Cette adhésion est lâche, permettant aux cellules macrophages de rouler sur la paroi vasculaire. Sur les cellules endothéliales, différentes molécules d'adhérence sont exprimées au niveau de la lésion. Les ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) sont des récepteurs d'adhérence qui se lient aux intégrines LFA-1 des leucocytes (Marlin & Springer, 1987). Les ICAM-1 constituent les molécules d'adhérence les plus importantes, puisque la présence seule des ICAM-1 est suffisante pour assurer la migration des leucocytes à travers la membrane (Sans *et al.*, 2001). Lorsqu'on utilise des anticorps pour bloquer les ICAM-1, les monocytes diminuent leur migration à travers l'endothélium puisqu'ils ne peuvent plus y adhérer correctement (Schenkel *et al.*, 2004).

Les VCAM-1 constituent une autre classe de molécules d'adhérence des cellules endothéliales qui se lient aux intégrines VLA-4 exprimées sur les leucocytes. Les VCAM-1 jouent un rôle encore plus important que les ICAM-1 au début de la formation des lésions d'athérosclérose. En effet, les souris déficientes en VCAM-1 présentent une réduction de 40 % de leurs lésions tandis que la déficience en ICAM-1 ne réduit pas les lésions (Cybulsky *et al.*, 2001). Le rôle principal des VCAM-1 serait d'induire l'ouverture des jonctions serrées entre les cellules endothéliales, par

l'activation de la GTPase Rho qui est responsable de l'arrangement des cadhérines, perturbant ainsi les complexes cadhérine-caténine responsables de maintenir les jonctions serrées entre les cellules (van *et al.*, 2003).

Outre les LDLox et les phospholipides oxydés, le CCL2 (MCP-1) et les MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) sécrétés par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, lymphocytes T et macrophages activés par les LDLox sont des chimiokines impliquées pour attirer et les monocytes (Boring *et al.*, 1998). L'administration d'anticorps monoclonal anti-MIF, diminuent de 75 % la présence des macrophages dans la plaque et diminuent la taille des lésions (Burger-Kentischer *et al.*, 2006).

Le MIF et le TNF- $\alpha$  sécrétés par les macrophages possèdent un effet autocrine et permettront d'augmenter la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Une fois les monocytes recrutés dans la paroi, ils seront stimulés par le *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) et le *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), ces cytokines activent leur différenciation en macrophages (Falk & Vogel, 1988). Ces deux facteurs de croissance sont synthétisés par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les monocytes différenciés en macrophages activés par les LDLox, principalement par la voie de NF $\kappa$ B (Rajavashisth *et al.*, 1998). La maturation des monocytes en macrophages est importante pour le développement de la maladie, puisque les souris transgéniques déficientes en M-CSF présentent une

résistance envers le développement des lésions d'athérosclérose (Smith *et al.*, 1995). L'inflammation de la paroi vasculaire est aussi causée par l'activation des TLR des macrophages (Edfeldt *et al.*, 2002). Outre des cytokines et chimiokines, les macrophages activés vont relâcher des vasoactivateurs tels que le NO, des endothélines et des écosanoïdes (Zeihner *et al.*, 1995) (Sugiyama *et al.*, 2001). Ainsi, les macrophages vont augmenter leur capacité à sécréter diverses cytokines, telles que l'IL-12 et l'IL-18; l'association de ces deux cytokines induit la production d'IFN- $\gamma$  (Davenport & Tipping, 2003). IFN- $\gamma$  est une puissante cytokine pro-inflammatoire produite par les monocytes, les macrophages, les cellules Th1 et les *lymphocytes Natural killer T* (NKT). Lorsqu'on injecte l'IFN- $\gamma$  de façon quotidienne chez des souris déficientes en apoE, la taille de leurs lésions double (Whitman *et al.*, 2002). La sécrétion de la cytokine IL-12 favorise la différenciation des lymphocytes T auxiliaires en lymphocytes Th1, lesquels vont sécréter l'IFN- $\gamma$ , qui inhibe le développement des lymphocytes Th2. Les lymphocytes Th1 favorisent l'inflammation en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-2, IL-12, INF- $\gamma$  TNF- $\alpha$  et TNF- $\beta$  qui augmentent l'athérosclérose. À l'inverse, les lymphocytes Th2 diminuent l'inflammation, car ils produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que IL-4, IL-10 et IL-13, qui sont considérées athéroprotectrices (Robertson & Hansson, 2006). Les macrophages contribuent à l'environnement inflammatoire de la plaque et leur fonction change selon leur polarisation M1/M2. Les macrophage M1 font partie de la voie orienté vers l'inflammation en présentant l'antigène aux lymphocytes qui, lorsque polarisés en Th1, assurent la défense de l'organisme envers les parasites intracellulaire

et les tumeurs (Mantovani *et al.*, 2009). Les macrophages se différencient en M1 en réponse aux cytokines inflammatoires telles que IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 (Mantovani *et al.*, 2005). Les macrophages deviennent polarisés en M2 par les cytokines IL-4 et IL-13. Les macrophages M2 sont davantage orientés envers le remodelage des tissus et l'angiogénèse. (Mantovani *et al.*, 2009). Les deux populations M1 et M2 coexistent dans la lésion d'athérosclérose, par contre la fraction M1 prédomine (Bouhlef *et al.*, 2007).

Une autre cytokine pro-inflammatoire, l'IL-1 est produite par les macrophages et les cellules endothéliales. Il a été démontré que les souris de 24 semaines déficientes en ApoE et en IL-1 $\beta$  présentent une diminution significative de 30 % de la taille de leurs lésions d'athérosclérose (Kirii *et al.*, 2003).

En plus de ses effets pro-inflammatoires, l'IL-1 stimule la prolifération des cellules musculaires lisses et la relâche d'enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire telles que les métalloprotéinases, l'élastase, la collagénase et les stromélysines (Dinarello, 2000) (Galis *et al.*, 1994). Les macrophages sécrètent également des enzymes protéolytiques qui détériorent la matrice dont les métalloprotéinases lesquelles dégradent le collagène. La perte de la matrice déstabilise la plaque et augmente le risque de rupture et de thrombose (Shah *et al.*, 1995).

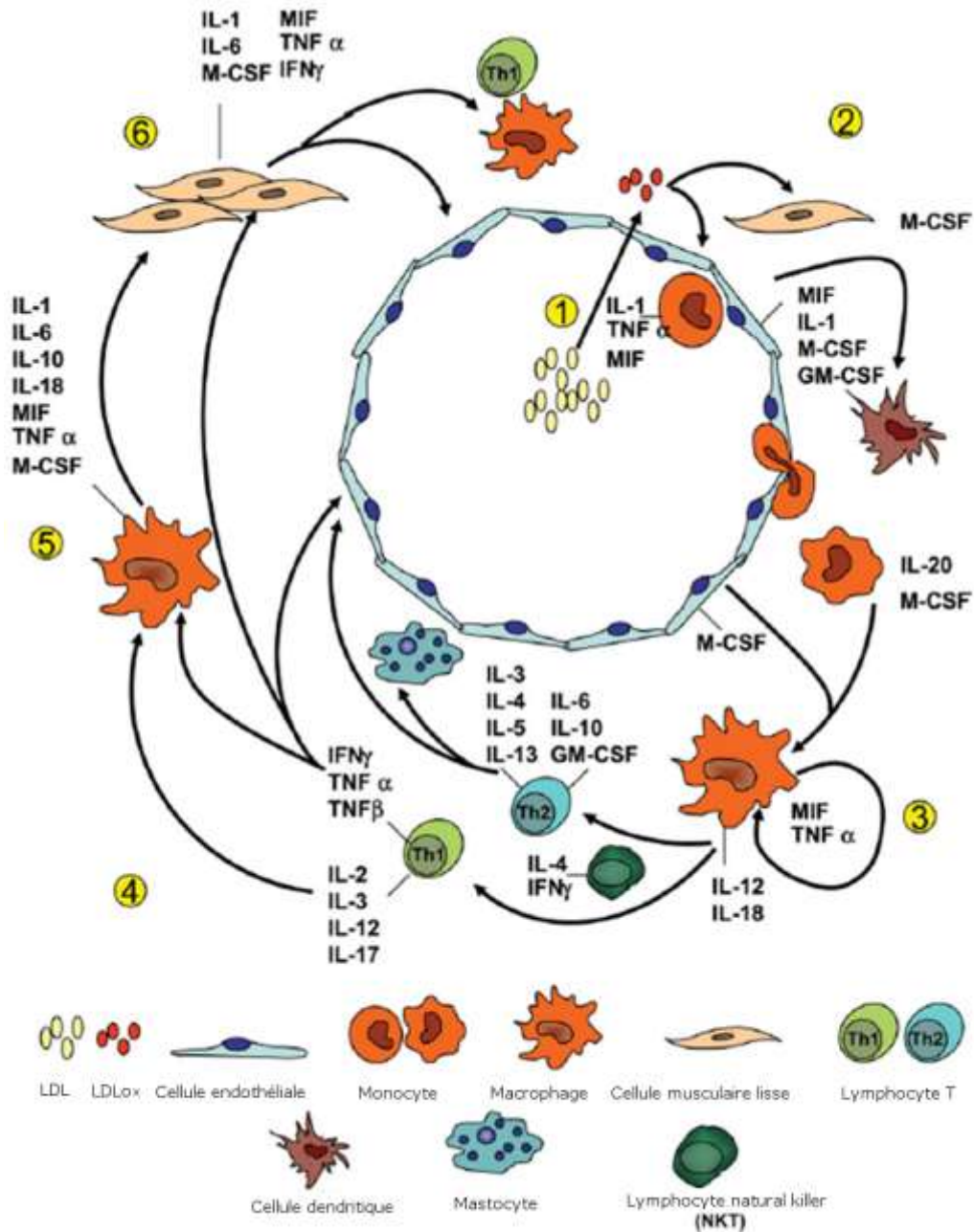


Figure 4. Les cytokines impliquées dans l'athérosclérose. (1) Les LDL s'infiltrent dans la paroi vasculaire et elles vont s'oxyder dans l'intima. (2) Les phospholipides des LDLox vont induire l'expression de cytokines IL-1, MIF, M-CSF et GM-CSF par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules dendritiques. Ces cytokines induisent la chimiotaxie des monocytes et vont induire leur maturation en macrophages. (3) Les macrophages activés par l'internalisation des LDLox sécrètent le MIF et le TNF $\alpha$  qui vont agir de façon autocrine pour amplifier



l'inflammation. (4) Les lymphocytes T seront activés par l'IL-12 et l'IL-18 sécrétés par les macrophages. La population de lymphocytes Th1 favorisée par rapport à la population de lymphocytes Th2, mène à la production de cytokines pro-inflammatoires. (5) Les macrophages stimulés par les lymphocytes Th1 vont amplifier l'inflammation. (6) Les cellules musculaires lisses, activées par les cytokines des macrophages et des lymphocytes Th1, vont elles aussi sécréter des cytokines et perpétuer le cycle inflammatoire. (Kleemann *et al.*, 2008).

## 9. Stabilité de la plaque

L'intima des artères est principalement composée de fibres de collagène de type 1, de type 2 et de type 3. Par contre, dans les régions des artères où il y a de l'athérosclérose, les fibres de collagène disparaissent au profit des protéoglycanes (Ross, 1999). Le réseau serré de collagène a comme propriété d'inhiber la prolifération des cellules. Lorsque le collagène est dégradé par des collagénases, les cellules musculaires lisses peuvent répondre à la stimulation par les cytokines et elles prolifèrent. Une lésion complexe d'athérosclérose va comporter un cap fibreux qui est causé par la prolifération des cellules musculaires lisses. La production de métalloprotéinases par les macrophages va promouvoir l'instabilité de la plaque en amincissant le cap fibreux. La rupture de la plaque va relâcher des facteurs hémostatiques et procoagulants tel que le facteur tissulaire (TF) (Wilcox *et al.*, 1989). La rupture de la plaque, suivie de la formation d'un thrombus est la cause principale des infarctus du myocarde consécutifs au blocage des artères coronaires et peut conduire au décès du patient (Hansson, 2005).

## 10. Traitements anti-athérosclérotiques

Différents traitements sont actuellement proposés aux personnes qui souffrent d'athérosclérose. Il s'agit de traitements sous forme de médicaments, les plus courants étant les statines et les fibrates. D'autres traitements tels que les mimétiques apoA-1 et les trapibes sont en phase expérimentale et études cliniques. Par ailleurs, la vaccination contre l'athérosclérose a été proposée comme nouvelle approche thérapeutique.

Chacun de ces traitements utilisent des mécanismes particuliers pour lutter contre la maladie.

### 10.1. Statines

Les médicaments les plus utilisés pour traiter l'athérosclérose sont les statines, inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG CoA). Le niveau de cholestérol total est modifiable par l'alimentation et la médication. Celles-ci influencent grandement la présence et la progression des lésions d'athérosclérose (Glass & Witztum, 2001). Les statines constituent une classe de médicament capable de réduire les niveaux de cholestérol plasmatiques et par le fait même, la mortalité chez les patients hypercholestérolémiques (Gould *et al.*, 1998) (Pedersen *et al.*, 2004) (Shepherd *et al.*, 1995). En dépit des bienfaits observés, les statines ne peuvent prévenir la progression de l'athérosclérose chez plusieurs patients (Glass & Witztum, 2001).

## 10.2. Fibrates

Les fibrates forment une famille de médicaments qui activent les récepteurs nucléaires de prolifération de peroxyosomes- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ). Les PPAR- $\alpha$  sont exprimés dans le foie, le coeur, les reins, les muscles, le tissu adipeux brun et les cellules vasculaires (Barter & Rye, 2008). L'activation de PPAR- $\alpha$  mène à la transcription de plusieurs gènes nécessaires à la régulation des lipoprotéines incluant: la lipoprotéine lipase (LPL), l'apolipoprotéine C3 (apoC3), la protéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9), *l'angiopoietin-like 3* (ANGPTL3), l'apolipoprotéine A1 (apoA1), l'apolipoprotéine A2 (apoA2) et l'apolipoprotéine A5 (apoA5) (Shah *et al.*, 2010). Le changement de transcription chez les LPL, apoC3 et apoA5 serait impliqué dans la lipolyse des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et les changements dans la transcription de apoA1 et apoA2 seraient impliqués dans l'augmentation de la synthèse des lipoprotéines de haute densité (HDL) (Barter & Rye, 2008).

## 10.3. Mimétiques apoA-I

Selon les études épidémiologiques, les niveaux plasmatiques élevés de HDL et de l'apolipoprotéine A-I diminuent le risque de développer des maladies cardiovasculaires (Kwiterovich, Jr., 1998). C'est par l'apolipoprotéine A-I que les HDL peuvent initier le transport inverse du cholestérol chez les macrophages via les transporteurs ABCA1 (Rader, 2006) (Brewer, Jr. *et al.*, 2004). Une nouvelle approche étudiée est le développement d'un peptide qui mime la structure de l'apoA-I tout en étant protégé des

peptidases. Cette approche pourrait permettre l'administration d'un traitement oral (Bloedon *et al.*, 2008) (Navab *et al.*, 2006).

#### **10.4. Trapibes**

Les trapibes forment une famille d'inhibiteurs de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP). Bloquer le CETP augmenterait les niveaux de HDL plasmatiques en bloquant le transfert des esters de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines possédant l'apolipoprotéine B, c'est-à-dire des LDL (de Grooth *et al.*, 2002). Les trapibes augmentent les niveaux de HDL, d'apolipoprotéine A et diminuent les niveaux de LDL et d'apolipoprotéine B (Brousseau *et al.*, 2004). L'utilisation des trapibes est controversée parce qu'une molécule, le torcetrapibe a induit des effets hypertenseurs hors-cibles mais d'autres molécules sont en développement (Nissen *et al.*, 2007) (Kastelein *et al.*, 2007).

#### **10.5. La vaccination**

La vaccination constitue l'une des armes les plus efficaces pour traiter les maladies. La technique de vaccination permet d'employer le système immunitaire, en utilisant des anticorps envers un antigène. L'immunité envers l'antigène peut s'effectuer par une immunisation passive ou active (Kindt *et al.*, 2007).

L'immunité passive implique le transfert d'anticorps à un receveur. Les chercheurs Emil Behring et Hidesaburo Kitasato ont été les premiers à montrer que l'immunité

induite chez un animal peut être transférée à un autre. D'ailleurs, les anticorps présents dans le lait maternel confèrent une immunisation passive à l'enfant (Kindt et al , 2007). L'immunisation passive induit une protection rapide, mais en contrepartie, étant donné que l'immunisation passive n'active pas le système immunitaire, la formation d'une réponse-mémoire est absente et la protection est donc transitoire.

Alors que l'immunité passive induit une protection transitoire, le but de l'immunisation active est d'induire une protection de longue durée et une mémoire immunitaire. L'immunisation débute avec l'injection d'une molécule (*antigène*) susceptible de susciter une réponse immunitaire. La présentation de l'antigène aux lymphocytes B se fait par les cellules présentatrices de l'antigène et cet événement contribue à l'activation et à la prolifération des lymphocytes B producteurs d'anticorps (Kindt et al , 2007).

#### **10.5.1. Vaccins contre l'athérosclérose**

Historiquement, les vaccins ont été utilisés pour traiter des maladies infectieuses, cependant plusieurs chercheurs ont observé que la production d'anticorps par une immunisation peut offrir une nouvelle approche pour traiter d'autres maladies dont l'athérosclérose. La production d'anticorps envers des molécules nécessaires au développement de l'athérosclérose permettrait d'empêcher ces molécules d'interagir avec ses cibles. Si la molécule injectée est suffisamment immunogène, on peut obtenir la production d'anticorps contre la molécule, c'est-à-dire une immunisation envers celle-ci. Il est possible d'augmenter l'immunogénicité d'une molécule en l'injectant avec

un adjuvant. Les adjuvants augmentent la réponse immunitaire. Par exemple, les lipopolysaccharides bactériens sont des ligands pour les TLR des macrophages. Les adjuvants ont pour effet de prolonger la persistance de l'antigène, d'augmenter le signal de costimulation et l'inflammation locale (Kindt et al , 2007). L'immunothérapie n'est donc plus restreinte qu'aux maladies infectieuses (de Jager & Kuiper, 2011). Les vaccins utilisent la technique de l'immunisation active pour permettre une protection de longue durée.

### **10.5.2. Vaccins contre l'influenza**

Il a été démontré que l'incidence des infarctus du myocarde est augmentée pendant l'hiver et les périodes de l'année associées avec les infections à l'influenza (Reichert *et al.*, 2004). De plus, des études ont montré que l'infection avec l'influenza augmente la progression de l'athérosclérose et l'inflammation dans les lésions. Le virus a la capacité d'infecter et de se loger dans les artères ce qui le rend propice à contribuer au développement de l'athérosclérose par l'inflammation causée par le système immunitaire inné (Gurfinkel *et al.*, 2002). Une étude sur un vaccin contre l'influenza a été menée pour vérifier ses effets athéroprotecteurs. Les chercheurs ont observé que les décès par des problèmes liés aux maladies cardiovasculaires sont quatre fois moins fréquents chez les patients qui ont été vaccinés contre l'influenza (Gurfinkel *et al.*, 2002).

### 10.5.3. Vaccins contre les LDLox

Les LDLox sont extrêmement immunogènes et sont responsables de l'initiation de l'inflammation dans les lésions d'athérosclérose. La présence d'anticorps anti-LDLox capables de se lier aux LDLox dans les lésions ont été découvert chez les patients atteints d'athérosclérose (Palinski *et al.*, 1989). Il y a donc eu une étude sur un vaccin contre les LDLox dans le but de produire suffisamment d'anticorps pour se lier aux LDLox et les empêcher d'être reconnues par les récepteurs éboueurs des macrophages. Dans cette étude expérimentale, des lapins ont été immunisés par des injections sous-cutanées de LDLox émulsionnées avec un adjuvant. Après 16 semaines, les lapins vaccinés contre les LDLox ont présenté une diminution des lésions au niveau de la crosse aortique de 48 % par rapport aux lapins traités avec le véhicule (NaCl 0,9 %). Un autre vaccin, mais cette fois-ci contre les LDL non-oxydées a été testé. Après 16 semaines, les lapins vaccinés contre les LDL ont présenté une diminution des lésions au niveau de la crosse aortique de 74 % par rapport aux lapins traités avec le véhicule. L'immunisation contre les LDL natives semble donc inhiber davantage le nombre de lésions par rapport à l'immunisation contre les LDLox. Cependant, l'auteur a observé qu'à 16 semaines, les titres des anticorps anti-LDLox étaient les mêmes chez les animaux immunisés avec les LDLox ou les LDL. Ce phénomène s'expliquerait par le fait que les particules de LDL natives, injectées aux lapins, subiraient une oxydation *in vivo*, ce qui augmenterait leur immunogénicité et engendrerait une réponse immunitaire contre les LDLox (Schwenke & Carew, 1989b)

#### 10.5.4. Vaccin contre l'apoB

Un vaccin contre l'apoB100, la principale apolipoprotéine des LDL, a été étudié. La rétention des LDL dans l'intima est causée par la liaison entre les glycosaminoglycanes et les charges positives sur la protéine apoB. C'est pourquoi l'on croit qu'un tel vaccin pourrait empêcher la rétention des LDL dans la matrice extracellulaire, une des étapes critiques du développement de l'athérosclérose. Des souris ont donc été immunisées avec des séquences peptidiques entre l'acide aminé 143 et l'acide aminé 210 de l'apolipoprotéine B. Après 25 semaines, les souris vaccinées ont présenté une diminution de 60 % de lésions d'athérosclérose par rapport aux souris témoins (Fredrikson *et al.*, 2003).

### 11. Hypothèse de recherche

Au cours de cette étude, nous avons étudié l'effet d'un vaccin ayant la capacité de contrer l'athérosclérose en empêchant la rétention des LDL. L'hypothèse de recherche consiste à démontrer que les anticorps iront se lier aux chaînes latérales des GAG, réduisant ainsi la liaison entre les protéoglycanes et les LDL, ce qui réduira leur rétention et préviendra le développement de l'athérosclérose. Avec ce vaccin, nous visons une immunisation active contre les GAG. Ainsi, l'organisme produira son propre remède, soit ses propres anticorps, contre la pathologie.

Cette étude est le fruit d'une collaboration avec le groupe de Docteure Vázquez au Centre d'Immunologie moléculaire de la Havane, qui a généré un anticorps murin P3.



Cet anticorps a la propriété de se lier aux gangliosides-N-glycolylés (NeuGc) et aux glycolipides sulfatés (Vazquez *et al.*, 1995) (Moreno *et al.*, 1998). Cet anticorps possède une séquence avec un motif d'arginines qui peut être représenté par R98-X-X-R100, où les chiffres représentent le numéro de l'acide aminé de l'anticorps. Ce segment est crucial pour la liaison de l'anticorps P3 avec les gangliosides. Un segment similaire est retrouvé chez l'apoB des LDL, cette séquence permettant la liaison avec les protéoglycanes (Lopez-Requena *et al.*, 2003) (Boren *et al.*, 1998). Une modification de l'anticorps P3 a été réalisée, le 99<sup>e</sup> acide aminé, l'acide glutamique, a été muté pour une arginine, E99 devient R99 (chP3R99). Ce nouvel anticorps possède la caractéristique d'avoir une plus forte affinité envers les molécules sulfatées telles que les GAG (Lopez-Requena *et al.*, 2007) (Fernandez-Marrero *et al.*, 2011). Le chP3S98 a été généré pour être utilisé comme contrôle négatif dans notre expérience. La modification de l'anticorps P3 est une sérine qui remplace le 98<sup>e</sup> acide aminé ce qui diminue l'affinité entre l'anticorps et les GAG et donc cet anticorps chP3S98 se lie avec une affinité moindre aux GAG. L'affinité entre chP3S98 et GAG a été testé par ELISA (Brito *et al.*, 2012).

Le domaine constant de l'anticorps chimérique chP3R99 est de nature humaine et son domaine variable de nature murine, dirigé contre les GAG. La partie murine représente 30 % de l'anticorps chimérique. La nature chimérique de l'anticorps augmente son caractère antigénique et c'est pourquoi cet anticorps a la capacité de générer une forte réponse d'anticorps anti-idiotypiques même en absence d'adjuvant ou de protéine de

transport (Vazquez *et al.*, 1998). D'autres anticorps basés sur le modèle du P3 ont été générés tel que le chP3S98 et chP3S31. Ces deux nouvelles mutations réduisent l'affinité des anticorps avec les GAG (Vazquez *et al.*, 1998).

La technique utilisée afin d'immuniser l'organisme contre les GAG repose sur une immunisation par la génération d'une cascade d'anticorps anti-idiotypiques. En fait, le principe de la cascade anti-idiotypique implique ou présuppose que la réponse anti-idiotypique peut répliquer les épitopes étrangers et les épitopes du soi (Richter, 1975). La cascade d'anticorps anti-idiotypiques repose sur la formation d'anticorps selon le schéma démontré à la Figure 5: 1) l'injection du chP3R99, un anticorps contre les GAG, active le système immunitaire qui produira alors des anticorps contre la partie variable du chP3R99, soit des anticorps anti-chP3R99. 2) Les diverses injections de chP3R99 ont pour but d'augmenter la quantité d'anticorps anti-chP3R99 et d'induire la formation d'anticorps anti-anti-chP3R99, de sorte que la structure du domaine variable du chP3R99 contre les GAG est reproduite. Bref, l'induction d'anticorps anti-idiotypiques en cascade signifie qu'on peut immuniser la souris aux GAG sans les lui injecter. Il est important de savoir que ce ne sont pas les anticorps anti-idiotypiques (anticorps de deuxième génération) qui possèdent l'effet athéroprotecteur, mais bien les anticorps anti-anti-idiotypiques (anticorps de troisième génération). Les anticorps de troisième génération sont ceux qui copient la première génération. La vaccination active par cascade d'anticorps anti-idiotypiques est un processus qui est déjà connu dans la littérature scientifique (Pal *et al.*, 2007). Au cours de cette étude, l'on doit

vérifier si le chP3R99 est capable de générer cette cascade d'anticorps anti-idiotypiques.

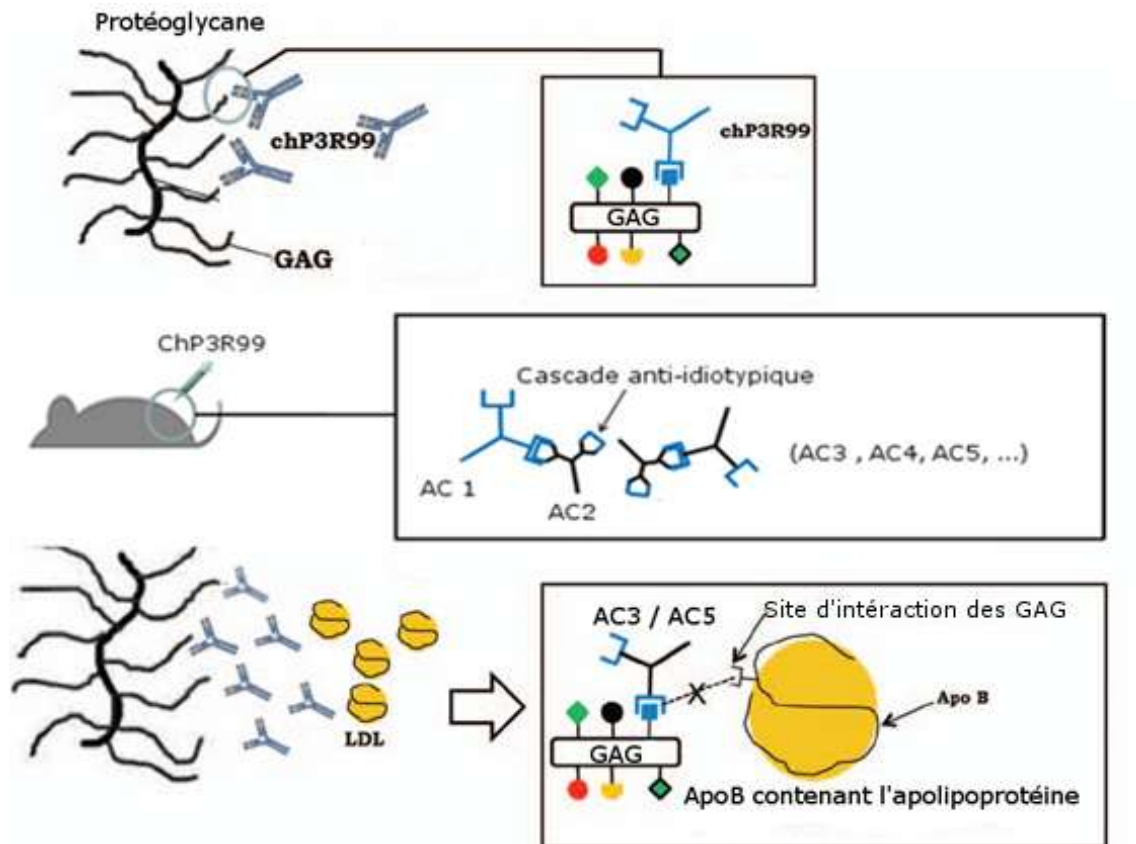


Figure 5. Représentation de la cascade d'anticorps anti-idiotypiques générée par le vaccin chP3R99. L'anticorps chP3R99 (AC1) induit une réponse immunitaire, ce qui produit la seconde génération d'anticorps (AC2) dirigés envers la partie variable de l'anticorps. La cascade se poursuit et la troisième génération d'anticorps (AC3) reconnaît la région variable de l'AC2. L'AC3 mime la structure de AC1 liant les GAG, donc l'AC3 lie aussi les GAG. Les anticorps générés bloquent la liaison de l'apoB aux chaînes des GAG.

(Brito *et al.*, 2012)

## 12. Objectifs de recherche

- Investiguer le potentiel anti-athérosclérotique d'une vaccination avec le chP3R99;
- Investiguer la génération d'une cascade d'anticorps anti-idiotypiques chez les souris immunisées avec l'anticorps chP3R99; et,
- Vérifier si l'anticorps est capable de se lier *in vivo* dans les lésions.

## **II. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 1. Protocole expérimental

Nous avons utilisé une lignée de souris C57BL/6 déficientes pour le gène apolipoprotéine E. À partir de leur quatrième semaine de vie jusqu'à la fin de l'expérience, ces souris ont été soumises à une diète riche en lipides et cholestérol ad libidum (*D12108, diète semi-purifiée AIN-76A, Research Diet Inc., New Brunswick, NJ*). La nourriture contient 40 % de lipides et 1,25 % de cholestérol, sans cholate. Ce modèle animal optimise le développement des plaques d'athérosclérose (Nakashima *et al.*, 1994).

Les souris ont débuté leur traitement à l'âge de 6 semaine d'âge. Un premier groupe de souris a reçu une injection sous-cutanée de 50  $\mu$ l d'anticorps chP3R99 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l). La dose 50  $\mu$ g a été choisie puisqu'elle est similaire à celle du vaccin 1E10 que notre équipe a étudiée antérieurement, lequel utilise le même mécanisme de la cascade anti-idiotypique.(Segatori *et al.*, 2012) Un deuxième groupe de souris, le groupe témoin négatif, a reçu une injection sous-cutanée de 50  $\mu$ l de PBS à la même fréquence que le premier groupe. Un troisième groupe de souris, le groupe témoin positif, a reçu une injection sous-cutanée de 30  $\mu$ l de EP 80317 quotidiennement à une dose de 300  $\mu$ g/kg/ jour à partir de la 6ème semaine de naissance. Un quatrième groupe contrôle négatif a reçu une injection sous-cutanée de 50  $\mu$ l de chP3S98 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) à la même fréquence que le groupe chP3R99. Un prélèvement sanguin (50  $\mu$ l) a été

effectué avant de débiter la vaccination. À la semaine 18, les souris ont été sacrifiées et les aortes prélevées pour les analyses morphométriques.

Pour cette étude nous avons utilisé deux différents protocoles, en variant la fréquence d'administration des injections et des prélèvements sanguins. Dans le protocole 1, les souris ont été injectées à la 6<sup>e</sup> semaine, 8<sup>e</sup> semaine, 10<sup>e</sup> semaine, 12<sup>e</sup> semaine et 15<sup>e</sup> semaine. Des prélèvements sanguins ont été prélevés à la 6<sup>e</sup> semaine, 7<sup>e</sup> semaine, 9<sup>e</sup> semaine, 11<sup>e</sup> semaine et 13<sup>e</sup> semaine.

Dans le protocole 2, les souris ont été injectées à la 6<sup>e</sup> semaine, 7<sup>e</sup> semaine, 8<sup>e</sup> semaine, 9<sup>e</sup> semaine, 13<sup>e</sup> semaine et 17<sup>e</sup> semaine. Des prélèvements sanguins ont été prélevés à la 6<sup>e</sup> semaine, 8<sup>e</sup> semaine, 10<sup>e</sup> semaine et 14<sup>e</sup> semaine.

Dans les deux protocoles, la diète enrichie en cholestérol (1,25%) et en lipides (40%) débute à la 4<sup>e</sup> semaine et le sacrifice est à la 18<sup>e</sup> semaine.

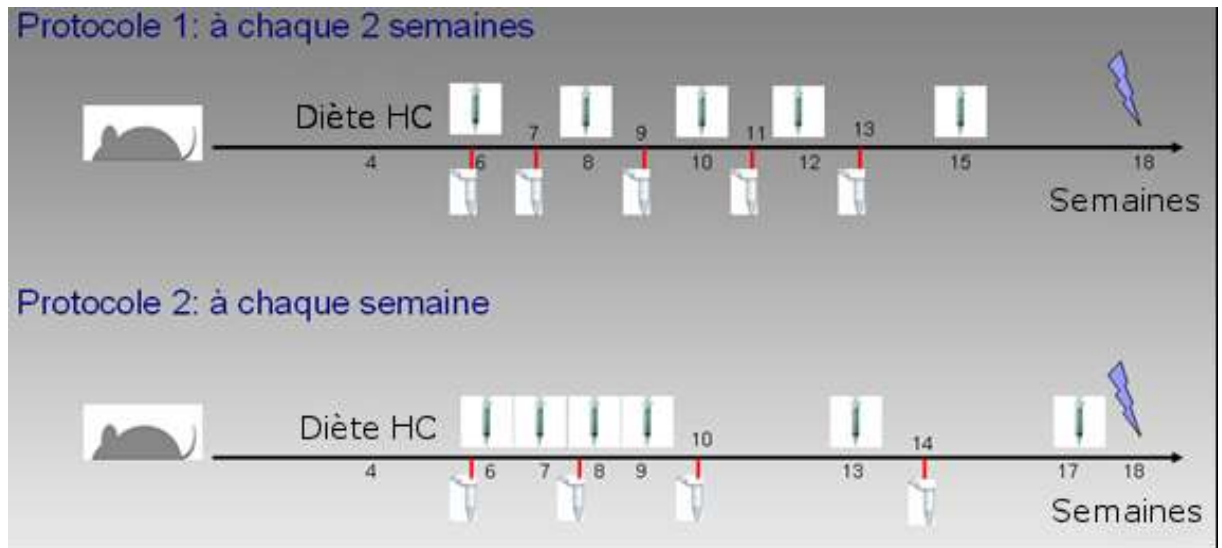


Figure 6. Le protocole d'administration du vaccin. Dans cette figure la diète riche en cholestérol et en lipides débute à la 4<sup>e</sup> semaine. Chaque injection est représentée par une seringue et chaque prélèvement sanguin est représenté par un eppendorf. À la 18<sup>e</sup> semaine, les souris ont été sacrifiées. (Mellal K, 2010).

## 2. Analyse morphométrique

À la 18<sup>e</sup> semaine d'âge, les aortes ont été disséquées après l'euthanasie des souris par exsanguination sous anesthésie à l'isoflurane, de la crosse aortique jusqu'aux artères iliaques, et ouvertes longitudinalement. Les aortes ont été fixées pendant 24 heures dans de la formaline tamponnée à 10 %, rincées avec de l'eau et ensuite conservées dans du PBS stérile à 4°C dans des cassettes d'histologie. La veille de la prise des photos, les aortes ont été déposées dans des eppendorffs contenant 1,5 ml de *Oil Red O* 7 % et incubées pendant 24 heures à 37°C. Après lavage à l'eau, méthanol, et eau, les aortes sont incubées avec un contre-colorant (*fast green*) et déposées sur une lame de



microscope avec des pinces de façon à les ouvrir afin d'en photographier la paroi intérieure par vidéomicroscopie.

L'analyse morphométrique a été réalisée avec le programme *Adobe Photoshop CS3* (Adobe) et le pourcentage de lésions a été calculé en mesurant la surface des lésions, représentées par les zones colorées en rouge avec le *Oil Red O* sur la surface totale de l'aorte. L'analyse morphométrique a été effectuée sur les souris du protocole 1 et du protocole 2.

### 3. Dosage des sérums des souris immunisées contre le chP3R99 ou GAG par ELISA

Chaque puit de la plaque d'ELISA (96 puits) a été recouvert avec l'anticorps chP3R99 (10  $\mu\text{g/ml}$ ), l'anticorps contrôle chP3S98 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) ou un GAG, soit l'héparine, le sulfate de chondroïtine ou le sulfate de dermatane, à 10  $\mu\text{g/ml}$  dans du PBS.

Le sérum utilisé pour l'ELISA de la réactivité du sérum envers le chP3R99 a été dilué à 1/200 avec du PBS. Le sérum utilisé pour l'ELISA de la réactivité du sérum envers les GAG a été dilué à 1/400. Chaque échantillon a été analysé en triplicata, auxquels ont été rajoutés des puits de contrôle.

L'anticorps secondaire utilisé est spécifique à la chaîne  $\gamma$  des IgG de souris couplés à l'enzyme HRP (Peroxydase de Raifort). La dilution des anticorps secondaires à l'IgG

est de 1/40000. L'incubation des plaques pour les ELISA vérifiant l'affinité du sérum envers le chP3R99 était de 1 heure à 37°C et les ELISA vérifiant l'affinité du sérum envers les GAG était de 1 heure à température pièce.

Après l'ajout du substrat pour la peroxydase, le TMB, la plaque d'ELISA a été lue avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm. Le sérum analysé provenait des souris du protocole 1.

#### 4. Imagerie optique *in vivo* avec l'appareil Optix MX3

La visualisation *in vivo* a été effectuée avec l'appareil Optix MX3 (*ART Advanced Research Technologies Inc*). Nous avons utilisé trois traceurs fluorescents marqués avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Un de ces marqueurs est l'anticorps anti-VCAM-1 marqué au FITC (VCAM-FITC) (*LifeSpan Bio Sciences* (LS-C105916)). Le chP3R99 couplé au FITC et le hR3 ont été marqués au Centre d'immunologie moléculaire de La Havane par l'équipe de Docteur Vázquez. La visualisation du VCAM-1 *in vivo* a été effectuée après l'injection de 10 µg IgG monoclonal, généré chez des rats, dans un volume de 1 µl/g par l'artère sous-clavière. Soixante-douze heures après l'injection de l'anticorps (VCAM-FITC), les souris ont été scannées avec l'appareil Optix. Par la suite, l'anticorps VCAM-FITC est éliminé de l'organisme des souris et une semaine plus tard, le chP3R99-FITC ou hR3-FITC ont été injectés par voie intraveineuse pour la visualisation. Ces anticorps ont été injectés à une dose de 10 µg, dans un volume de 1 µl/g. Quarante-deux heures après l'injection de l'anticorps

(chP3R99-FITC ou hR3-FITC), les souris ont été scannées avec l'appareil Optix. Les résultats ont été analysés avec le programme Optixview. L'intensité de fluorescence est calculée en compte normalisé (NC), ce qui représente le nombre de photons émis par le laser (mW) par unité de temps (sec) sur une surface couvrant 1 mm<sup>2</sup>.  $NC = (\text{Photon compté}/\text{mm}^2 \cdot \text{mW}^{-1} \cdot \text{sec})$ . Les souris analysées dans cette expérience provenaient du protocole 1.

## 5. Immunohistochimie

Les artères brachiocéphaliques des différents groupes de souris du protocole 1 ont été prélevées soit celles qui recevaient des injections aux deux semaines. Ces artères ont été colorées par immunohistochimie par différent anticorps, anti-CD68, anti-iNOS. La coloration a été effectuée sur les coupes de l'artère brachiocéphalique et non pas sur l'artère totale.

L'anticorps primaire a été dilué à 1/100 et appliqué sur les lames pendant une heure à température de pièce. L'anticorps anti-iNOS (*Novus Biologicals*) et l'anticorps anti-CD68 (*Serotech*). L'anticorps de lapin secondaire dilué à 1/100 anti-rat (Sigma-Aldrich), couplé à la biotine a été appliqué sur les lames pendant 1 heure. L'anticorps souris tertiaire dilué à 1/100 (Sigma-Aldrich), streptavidine-peroxydase a été appliqué sur les lames pendant 1 heure (*Jackson ImmunoResearch Laboratories*). Le réactif DAB (diaminobenzidine), (*Sigma-Aldrich*) a été appliqué sur les lames. La coloration brune est apparue après environ 2 minutes. Quand la coloration fut relativement forte,

la réaction a été arrêtée avec un bref lavage dans un bain de PBS. Les photos ont été prises avec le microscope *Axio de Zeiss*. L'analyse quantitative a été réalisée avec le programme *Adobe Photoshop CS3* (Adobe). La quantité de macrophages a été calculée en mesurant la surface des macrophages, représentée par les zones brunes, sur la surface totale de la coupe de l'artère.

## 6. L'analyse des lipides sériques dans le sérum

Les concentrations totales du cholestérol plasmatique, des triglycérides et du cholestérol HDL ont été analysées en utilisant les kits commerciaux (*Thermo Electron Corporation et Sigma*). Le cholestérol LDL a été calculée en utilisant la méthode de Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972). L'analyse des lipides a été effectuée avec le sérum des souris des protocoles 1 et 2.

## 7. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel *Prism Graphpad*. La comparaison entre les groupes traités et le groupe témoin a été réalisée avec un test d'analyse de la variance (ANOVA) suivie par un post-test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples. La valeur du P inférieure à 0,05 a été considérée comme significativement différente.

### **III. RÉSULTATS**

## 1. Analyse morphométrique

Le premier objectif de cette étude était de vérifier si le vaccin pouvait diminuer le développement des lésions d'athérosclérose par analyse morphométrique. L'injection sous-cutanée de 50  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) d'anticorps chP3R99, administré à raison de 5 injections hebdomadaires, a réduit la taille des lésions d'athérosclérose de 40 % ( $p < 0,01$ ) par rapport au groupe témoin ayant reçu du PBS (Figure 7). Le pourcentage de réduction des lésions athérosclérotiques est similaire à celui observé chez les souris traitées par le EP 80317, un ligand sélectif du récepteur CD36 qui a été utilisé comme contrôle positif dans nos études.

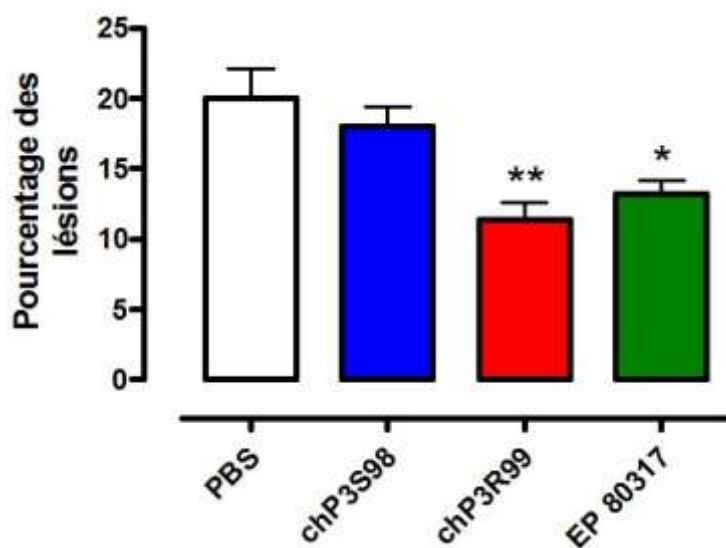


Figure 7. Effets anti-athérosclérotiques du EP 80317 et du chP3R99 par comparaison au groupe témoin ayant reçu du PBS. Le groupe PBS a une moyenne de 20,37% et un erreur type de la moyenne de 0,47, le groupe chP3S98 a une moyenne de 19,45% et un erreur type de la moyenne de 0,40, le groupe chP3R99 a une moyenne de 12,31% et un erreur type de la moyenne de 0,42 et le groupe EP 80317 a une moyenne de 13,58 et un erreur type de la

moyenne de 0,23. (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01 versus le groupe traité PBS)  
(Chaque groupe possède un n entre 8 et 10 souris)

L'analyse morphométrique a été réalisée pour une autre étude investiguant l'effet d'une administration hebdomadaire de 50 µg de chP3R99. Cette étude a permis de vérifier que la fréquence d'injection ne modifiait pas le développement des lésions d'athérosclérose. En effet, nous avons obtenu un résultat similaire avec les deux protocoles qui sont comparés à la Figure 8, soit une réduction de 43 % (p < 0,01) par rapport au groupe PBS pour une administration du vaccin aux deux semaines, et de 40 % (p < 0,01) pour une administration hebdomadaire, sans différence significative entre les deux protocoles (Figure 8).

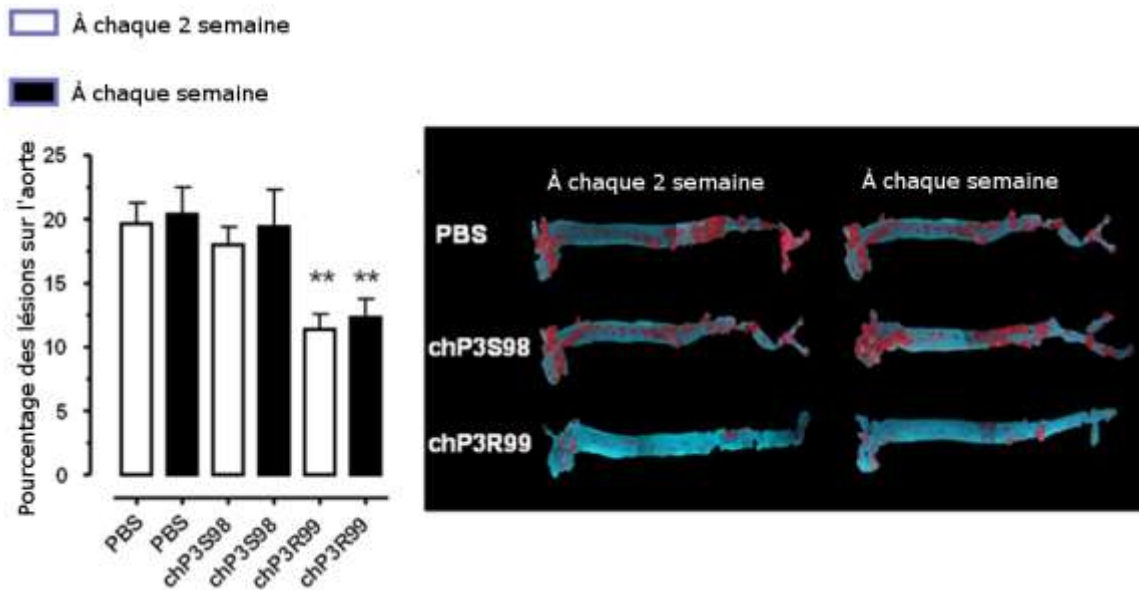


Figure 8. Pourcentage de réduction des lésions athérosclérotiques par analyse morphométrique des aortes colorées au *Oil Red-O*, selon le protocole d'injection à chaque semaine ou à chaque 2 semaines. \*\*: p < 0,01 par comparaison aux groupes témoins respectifs traités avec le PBS. Dans le groupe de souris injectées à chaque 2 semaines: le groupe PBS a une

moyenne de 20.02% et un erreur type de la moyenne de 0,38, le groupe chP3S98 a une moyenne de 18.01% et un erreur type de la moyenne de 0,32 et le groupe chP3R99 a une moyenne de 11.37% et un erreur type de la moyenne de 0.36. Dans le groupe injecté à chaque semaine: le groupe PBS a une moyenne de 20.37% et un erreur type de la moyenne de 0,47, le groupe chP3S98 a une moyenne de 19.45% et un erreur type de la moyenne de 0.40 et le groupe chP3R99 a une moyenne de 12.31% et un erreur type de la moyenne de 0.42. (n entre 8 et 10 par groupe).

## 2. Dosage du cholestérol et des lipides sériques

Le cholestérol total, le cholestérol HDL et les triglycérides ont été dosés dans le sérum de souris. Ces dosages nous ont permis de montrer que les effets anti-athérosclérotiques du vaccin ne sont pas reliés à un effet hypocholestérolémiant. En effet, il n'y a pas de différence significative entre les groupes de souris témoins ou vaccinées pour le cholestérol total, le cholestérol HDL, les triglycérides et le cholestérol LDL, ayant été calculé avec la formule de Friedewald (Friedewald *et al*; 1972) (Figure 9).



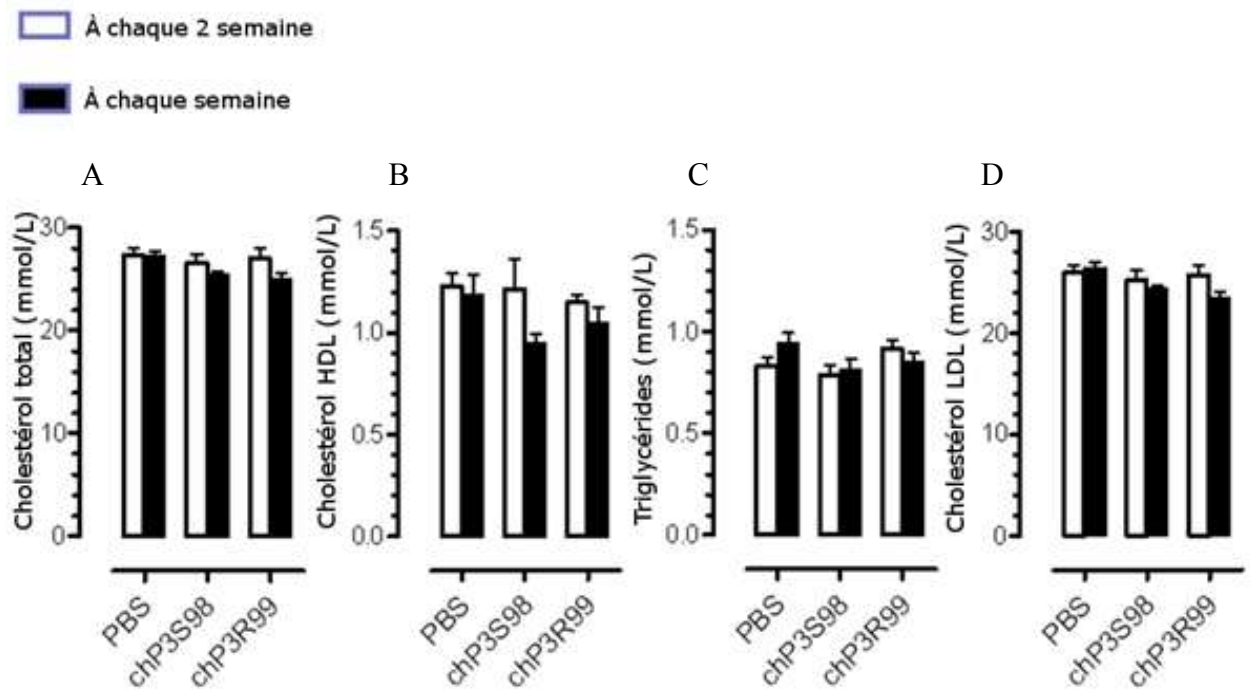


Figure 9. Niveau du (A) cholestérol total, (B) du cholestérol HDL et (C) des triglycérides sériques et (D) du cholestérol LDL. (n entre 8 et 10 par groupe)

### 3. La réactivité du sérum contre le chP3R99

L'induction de la production d'anticorps contre le chP3R99 est la première étape pour la génération d'une cascade d'anticorps anti-idiotypiques. Les anticorps sériques anti-chP3R99 sont les anticorps de deuxième génération (AC2), considérant l'anticorps injecté comme étant l'AC1.

La capacité du mutant chP3S98 à générer des anticorps chP3S98 et la cascade d'anticorps anti-idiotypiques ont été analysés. La réactivité du sérum des souris injectées avec du chP3S98, lorsque testé par ELISA contre le chP3S98, a aussi

augmenté envers le mutant en fonction du temps, mais cette réactivité était moins importante que celle induite par le chP3R99 par comparaison au sérum préimmun. On observe un plateau dans la formation d'anticorps anti-chP3R99 à la dixième semaine ( $p < 0,01$ ) (Figure 10).

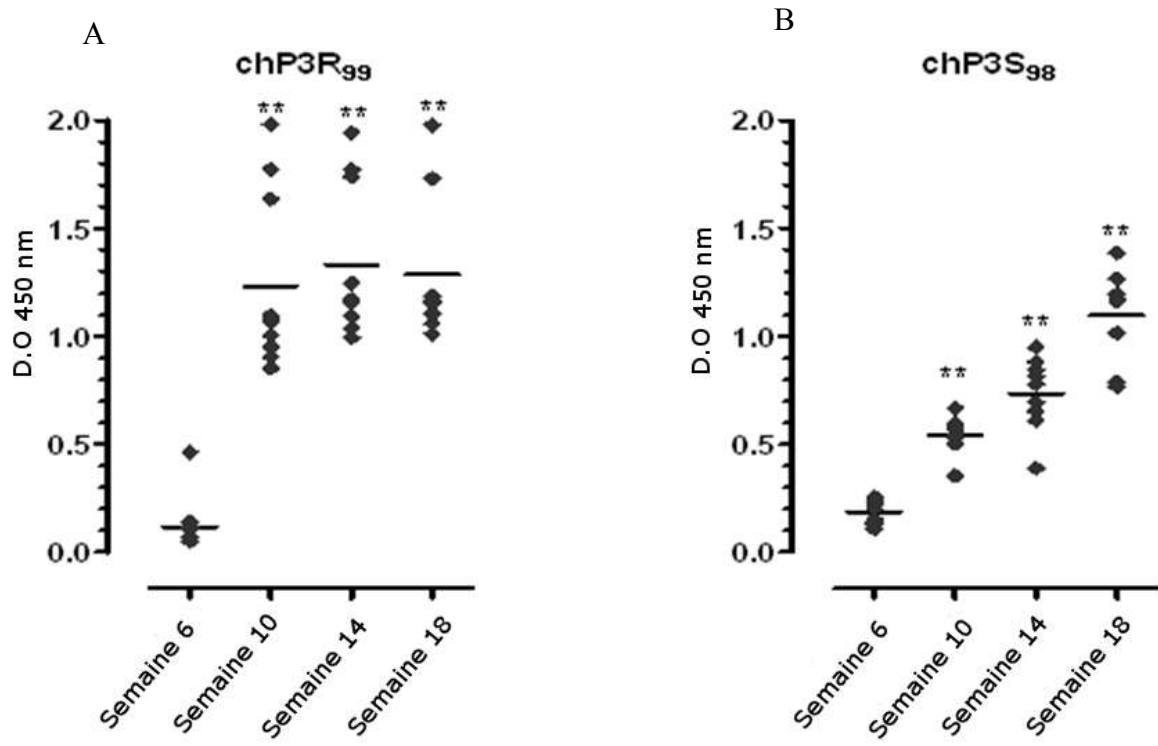


Figure 10. La réactivité du sérum contre le chP3R99 (A) ou le chP3S98 (B) déposés dans des plaques de 96 puits. La réaction a été révélée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 450 nm. \*\*:  $p < 0,01$  par comparaison au sérum préimmun (semaine 6) ( $n=10$  par groupe).

#### 4. Dominance des anticorps anti-idiotypiques

L'injection de l'anticorps chP3R99 produit aussi des anticorps anti-isotypiques contre la fraction Fc, partie constante de l'anticorps injecté. Nos résultats ont montré que la

réactivité totale du sérum des souris immunisées envers le chP3R99 est dirigée contre les fractions constante et variable, mais que les anticorps anti-idiotypiques produits chez les souris sont prédominants. En effet, lorsque le sérum est préabsorbé avec l'anticorps hR3, qui bloque le domaine Fc, la réactivité restante envers le chP3R99 demeure très importante (Figure 11). En accord avec ces observations, la réactivité restante contre le hR3 du sérum préabsorbé avec ce dernier est faible. Cette expérience nous permet de démontrer que la réactivité du sérum envers le chP3R99 est conservée lorsqu'on préincube le sérum avec du hR3, confirmant une dominance de la fraction idiotypique sur la fraction isotypique.

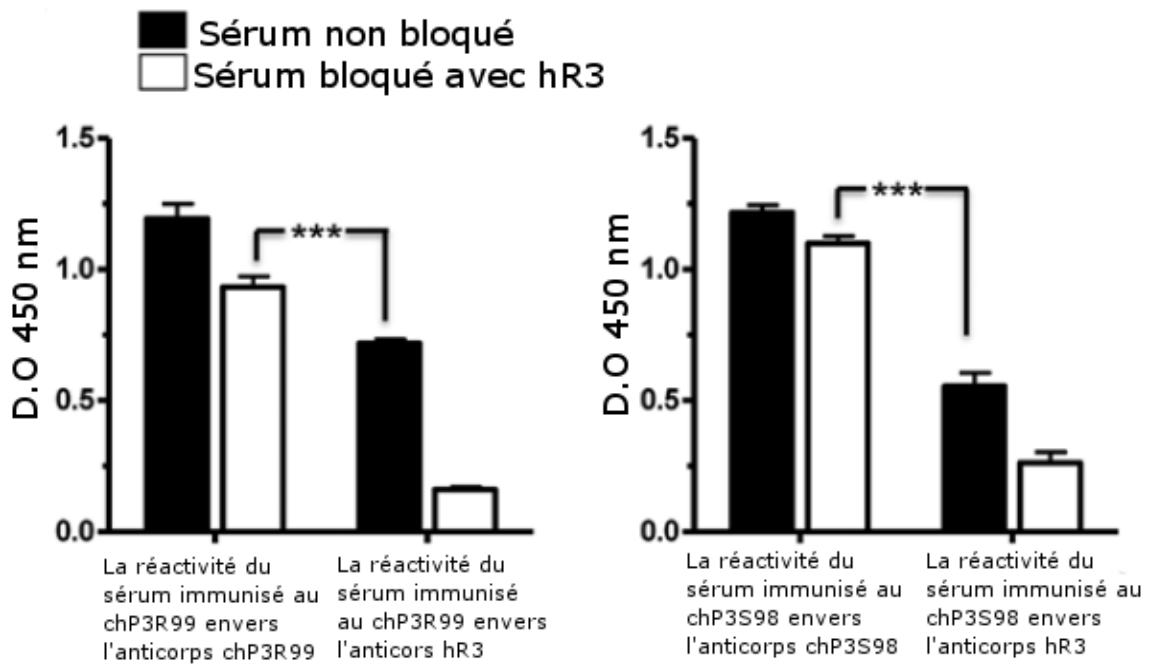


Figure 11. Dominance des anticorps anti-idiotypiques dans le sérum des souris immunisées avec le chP3R99. \*\*\*:  $p < 0,001$  comparé avec le sérum préincubé avec du hR3 (n=9 par groupe).

## 5. La réactivité du sérum envers les glycosaminoglycanes

La réactivité du sérum de souris injectées avec le chP3R99, ainsi que la réactivité du sérum des souris injectées avec le chP3S98, a été testée contre différents types de GAG dont l'héparine, le sulfate de dermatane et le sulfate de chondroïtine. Nous avons observé que le sérum des souris injectées avec du chP3R99 présente une augmentation de réactivité sérique significativement différente entre la 10e et la 18e semaine du protocole par rapport au sérum préimmun prélevé à la 6e semaine (Figure 12 A, C et E). À l'opposé, la réactivité du sérum des souris injectées avec du chP3S98 n'a pas augmenté de façon significative par rapport au sérum préimmun (Figure 12 B, D et F).

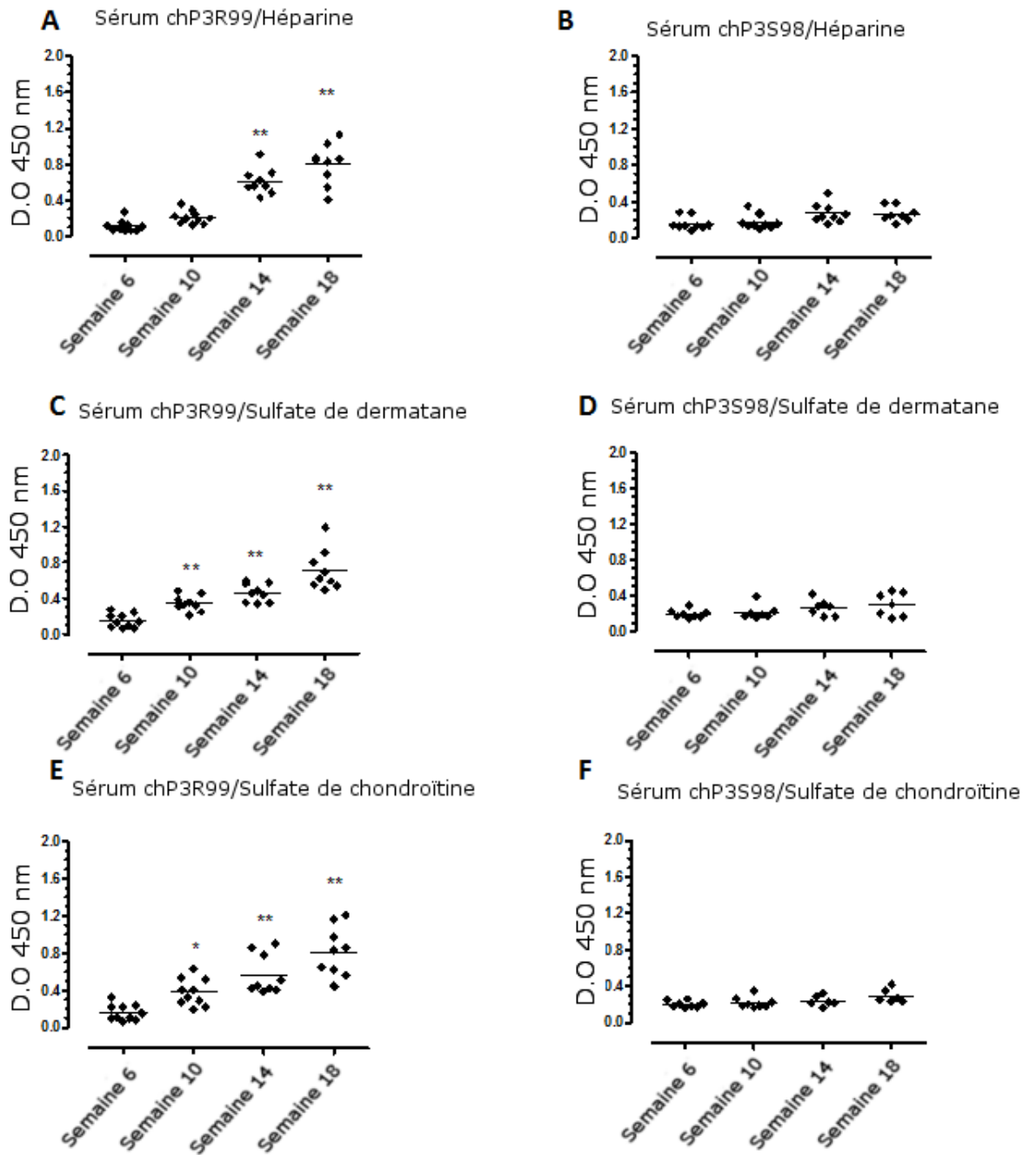


Figure 12. La réactivité du sérum des souris immunisées avec du chP3R99 ou du chP3S98 envers les glycosaminoglycanes. \*:  $p < 0,05$  \*\*:  $p < 0,01$  versus le sérum préimmun (n entre 8 et 10 par groupe)

## 6. Visualisation *in vivo* du VCAM-1 et du site de liaison de chP3R99

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé l'appareil Optix MX3 permettant de faire de l'imagerie moléculaire *in vivo* chez les rongeurs. Deux groupes de souris apoE<sup>-/-</sup> de 18 semaines ont été injectées avec 10 µg d'anticorps anti-VCAM liés à un fluorochrome, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Les souris ont été scannées 48 heures après l'injection du fluorochrome lié à l'anticorps tel que montré à la Figure 13 A1 et A2. Puisque les molécules de VCAM-1 endothéliales sont principalement exprimées dans les régions où il y a des lésions d'athérosclérose, le signal obtenu devrait correspondre à l'interaction entre l'anticorps marqué et le VCAM-I au niveau des lésions vasculaires (*Mine et al; 2002*). L'intensité de la fluorescence entre les deux groupes est similaire, indiquant que la taille des lésions entre les deux groupes est comparable, tel que montré au panneau A3 de la Figure 13. Une semaine après l'injection du anti-VCAM-FITC, le groupe 1 a reçu une injection d'un anticorps contrôle hR3 lié à FITC, et le groupe 2, une injection de chP3R99 lié à FITC, à la Figure 13 B1 et B2. Tel qu'observé *in vivo*, les souris injectées avec du chP3R99 ont eu un signal de fluorescence plus intense que les souris injectées avec du hR3-FITC, tel qu'illustré au panneau B3.

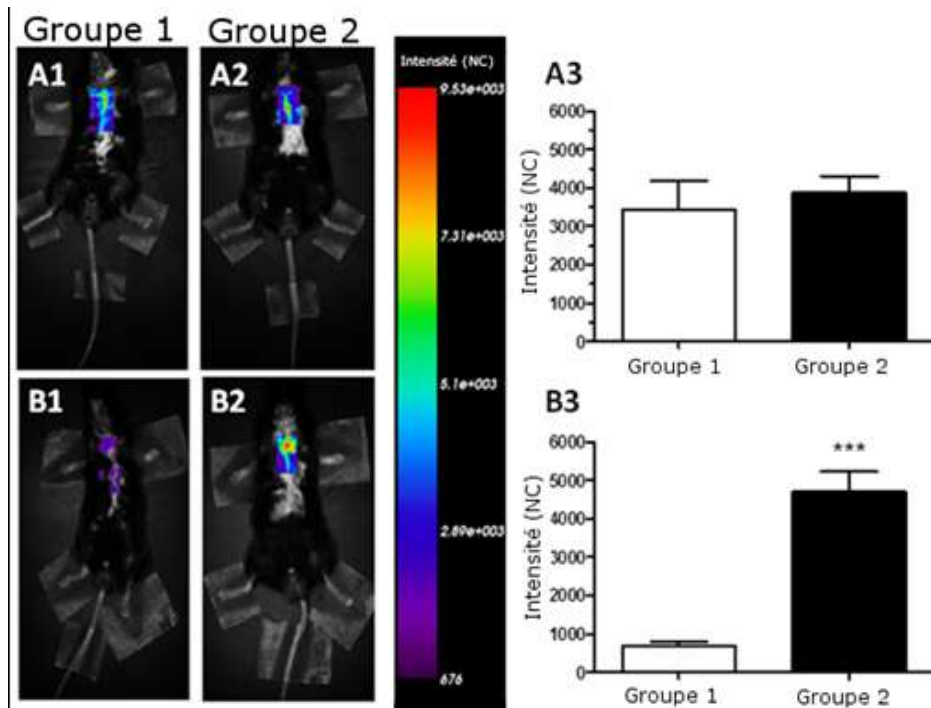


Figure 13. Visualisation *in vivo* de la localisation du VCAM-I et des sites de liaison de l'anticorps chP3R99. Deux groupes de souris non traitées avec le vaccin chP3R99 ont été injectés avec l'anticorps VCAM-FITC (A1 et A2), l'intensité de la fluorescence a été mesurée chez les deux groupe (A3). Le groupe 1 a été injecté avec l'anticorps hR3-FITC (B1), et le groupe 2 avec l'anticorps chP3R99-FITC (B2). L'intensité de la fluorescence a été mesurée chez les deux groupe (B3). \*\*\*:  $p < 0,001$  versus le témoin groupe 1. (n=6 par groupe)

## 7. Liaison du chP3R99 dans les lésions d'athérosclérose

Dans cette étude, deux groupes de souris apoE<sup>-/-</sup> de 18 semaines ont reçu une injection de 10 µg de chP3R99-FITC. Les souris du groupe 1 ont préalablement reçu 5 doses de 50 µg de chP3R99, de la semaine 6 à 10, suivie d'une cinquième dose à la semaine 14. Les souris du groupe 2 ont reçu préalablement des injections de PBS. Les souris du

groupe 2 présentent donc davantage de lésions d'athérosclérose,  $20 \pm 6\%$  alors que les souris du groupe 1 présentent moins de lésions, environ  $11 \pm 4\%$  (Figure 8). Les souris du groupe 2 ont présenté une intensité de fluorescence significativement supérieure aux souris du groupe 1 (Figure 14 A3).

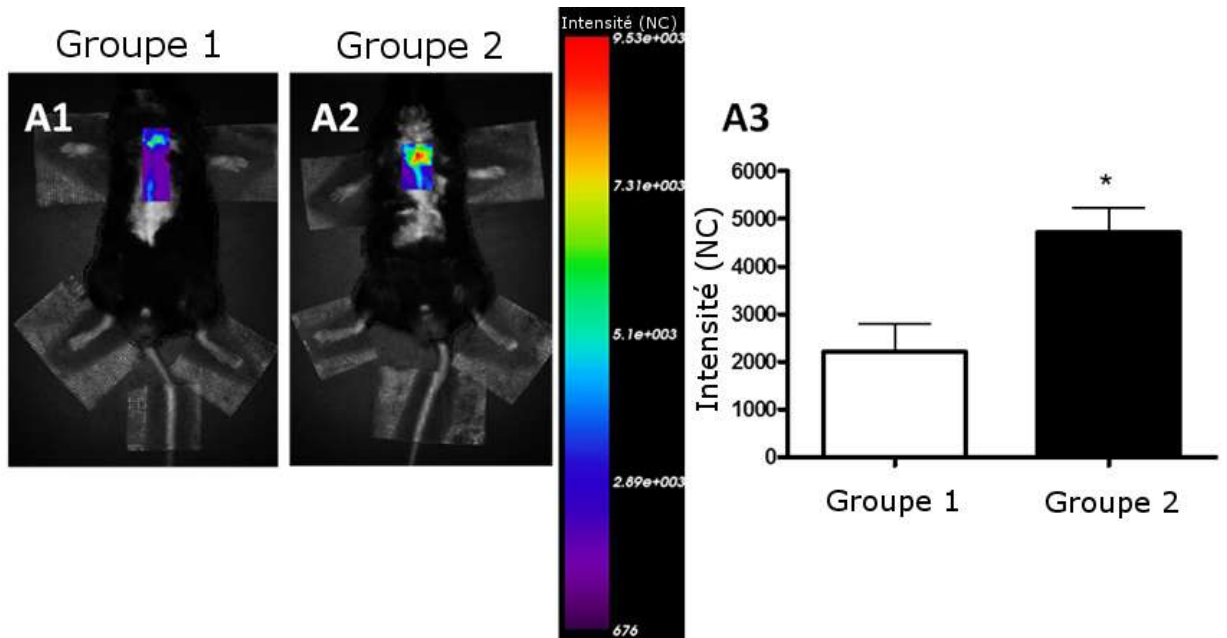


Figure 14. Augmentation de la liaison du chP3R99 chez les souris ayant davantage de lésions d'athérosclérose. Souris traitées avec le vaccin chP3R99 injecté avec le anti-VCAM-FITC (A1), Souris non traitées avec le vaccin chP3R99 injecté avec le anti-VCAM-FITC (A2) et l'intensité de la fluorescence des deux groupes (A3).\*:  $p < 0,05$  versus le groupe 1 contrôle. (n=6 par groupe).

## 8. Élimination du chP3R99-FITC de l'organisme

Des souris apoE<sup>-/-</sup> de 10 semaines ont reçu une injection intraveineuse de chP3R99-FITC. À différents temps les souris ont été scannées et l'intensité de la fluorescence a été mesurée au niveau de la crosse aortique. Cinquante-sept heures



après l'injection de l'anticorps, on remarque que l'intensité du marqueur atteint un pic d'intensité et que le marqueur fluorescent commence à être éliminé.

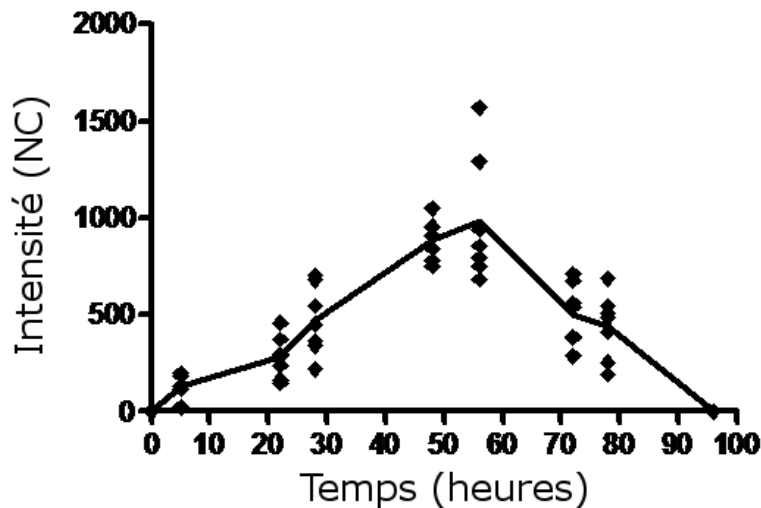


Figure 15. Cinétique du chP3R99-FITC après son injection intraveineuse (n=7).

## 9. Caractérisation des différentes populations de macrophages dans les lésions d'athérosclérose

Les artères brachiocéphaliques ont été prélevées de souris apoE<sup>-/-</sup> de 18 semaines d'âge. Par la suite, les coupes d'artères transversales brachiocéphaliques ont été colorées par immunohistochimie avec des anticorps primaires anti-CD68 et anti-iNOS et des anticorps secondaires couplés avec HRP. La surface de la zone colorée en présence du substrat a été mesurée à l'aide du logiciel *Photoshop (Adobe)* et exprimés en pourcentage de la surface totale de la lésion. Les souris, qui ont reçu des injections de l'anticorps chP3R99, ont présenté une diminution significative du pourcentage de

CD68 et de iNOS par rapport aux souris témoins injectées avec du PBS, Figure 16. Des coupes d'artères colorées avec l'anti-CD68 et l'anti-iNOS sont représentées dans cette figure.

Il y a une réduction de 54% des macrophages marqués avec le anti-CD68 dans le groupe traité avec du chP3R99 comparé avec le groupe traité avec le PBS et il y a une réduction de 59% des macrophages marqués avec le anti-iNOS dans le groupe traité avec du chP3R99 comparé avec le groupe traité avec le PBS.

CD68

iNOS

PBS



chP3S31



chP3R99



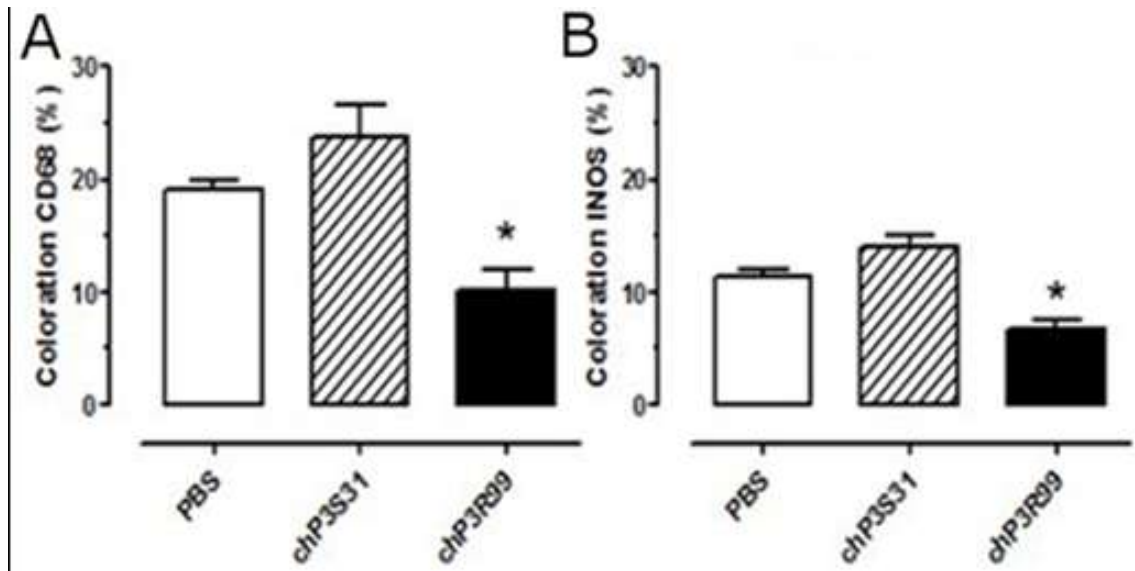


Figure 16. Caractérisation des différentes populations de macrophages dans les lésions d'athérosclérose. Pourcentage de la coloration de CD68 (A), pourcentage de coloration de iNOS (B). \*;  $p < 0,05$  par rapport aux souris injectées avec du PBS. (n de 4 par groupe)

## IV. **DISCUSSION**

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire cardiovasculaire à l'origine de complications tels que la maladie cardiaque ischémique et les accidents cérébraux vasculaires. Cette pathologie représente la première cause de mortalité dans les pays industrialisés malgré la prise de médicaments modernes qui réduisent le niveau de cholestérol plasmatique tels que les statines. La vaccination pourrait être une nouvelle approche prometteuse pour contrer cette maladie, c'est pourquoi un vaccin composé de l'anticorps chP3R99 a été développé. Le mécanisme d'action du vaccin consiste en une immunisation active contre les glycosaminoglycanes via la génération d'une cascade anti-idiotypique diminuant par le fait même la rétention des LDL dans l'intima de la paroi vasculaire. L'avantage de l'immunisation active est qu'elle permet de réduire la dose injectée de l'antigène. La génération d'une cascade d'anticorps anti-idiotypiques induit une immunisation contre les GAG par le biais de l'injection de la protéine chP3R99 sans que l'on ait besoin de les injecter.

Rappelons que l'objectif de ce travail de recherche visait principalement à vérifier trois hypothèses concernant ce vaccin:

- premièrement: vérifier si la vaccination avec le chP3R99 réduit la taille des lésions d'athérosclérose;
- deuxièmement: vérifier si une cascade d'anticorps anti-idiotypique est induite chez la souris immunisée avec l'anticorps chP3R99; et,
- troisièmement: vérifier si l'anticorps est capable de se lier *in vivo* dans les lésions.

Notre projet a étudié les effets du premier vaccin qui tente de réduire les lésions en empêchant la rétention des LDL à la matrice sous-endothéliale (Brito *et al.*, 2012). Il existe présentement d'autres vaccins contre l'athérosclérose en développement qui utilisent d'autres cibles, dont le LDLox, le LDL et l'apoB (Fredrikson *et al.*, 2003) (Schwenke & Carew, 1989b). Par contre, il est difficile de comparer les résultats de diminution de la taille des lésions puisque les études n'utilisent pas les mêmes modèles animaux ou les mêmes périodes de temps pour évaluer celles-ci. A tout le moins, la littérature sur le sujet nous renseigne sur le fait que ces différents traitements n'utilisent pas les mêmes mécanismes contre l'athérosclérose. C'est pourquoi, il serait intéressant de vérifier si ces différents vaccins ont des effets synergiques sur la diminution des lésions.

## 1. La vaccination avec le chP3R99 réduit la taille des lésions d'athérosclérose

L'analyse morphométrique des aortes a révélé une réduction de 40 % des lésions pour les groupes de souris traités au chP3R99 et par le EP 80317 par rapport au groupe témoin traité au PBS (Figure 7). La réduction des lésions d'athérosclérose chez les souris traitées au EP 80317 est similaire aux résultats antérieurs du laboratoire (Harb *et al.*, 2009). Ces résultats nous permettent de conclure que la vaccination au chP3R99 permet de réduire la taille des lésions d'athérosclérose.

Par ailleurs, le traitement au chP3R99 possède un avantage sur le témoin positif (EP 80317) si on considère la fréquence d'injection. En effet, l'injection du chP3R99 a été effectuée de façon hebdomadaire ou aux deux semaines tandis que le EP 80317 est injecté quotidiennement. L'un des avantages de la vaccination active, par rapport à l'injection passive d'anticorps, consiste en une réduction de la dose requise d'anticorps.

Par la suite, nous avons testé deux protocoles différents: le premier consistant en une injection à chaque deux semaines de l'anticorps chimérique et le deuxième, par une injection à chaque semaine. Les deux protocoles ont montré des résultats similaires, soit une diminution de 40 % des lésions pour le protocole avec les injection à chaque



semaine et une diminution 43% pour le protocole avec les injections à chaque 2 semaine. Ainsi, la fréquence d'injection du chP3R99 n'a pas induit de différences significatives (Figure 8). Puisqu'il n'y a pas eu de différence entre les injections à chaque semaine ou à deux semaines, il serait intéressant de vérifier si l'espacement entre les injections pourrait être augmenté ce qui faciliterait l'administration du vaccin.

Le mécanisme du vaccin repose sur le fait que la rétention du LDL aux GAG augmente l'oxydation des LDL. Bloquer cette liaison avec des anticorps diminue l'oxydation des LDL. L'étude de Brito a démontré que le vaccin chP3R99 possède la propriété de diminuer l'oxydation du LDL. Par un essai *in vitro*, l'oxydation du LDL en présence de  $\text{Cu}^{2+}$  dans une plaque préincubée avec du sulfate de chondroïtine a été mesurée avec du malondialdéhyde. L'ajout d'IgG chP3R99 purifié de sérum de souris immunisé avec le vaccin chP3R99 diminue de 70% l'oxydation du LDL (Brito *et al.*, 2012).

Un nouveau contrôle négatif a été testé, l'anticorps chP3S98. Le chP3S98 a subi la mutation d'un résidu d'arginine pour une sérine au 98<sup>e</sup> acide aminé réduisant de façon importante l'affinité de l'anticorps envers les GAG. Les résultats ont montré que les souris injectées avec le chP3S98 ne présentent pas de différences significatives de la taille de leurs lésions par rapport à celles des souris injectées avec du PBS. Ce résultat appuie le rôle important des GAG dans le développement des lésions et suggère que le mécanisme de protection du chP3R99 interfère la rétention des LDL. Les concentrations sériques de cholestérol, de HDL et de triglycérides ont été dosée dans le

plasma de chaque souris. La concentration sérique du LDL a été déterminée par la méthode Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972) (Figure 9). Pour chaque groupe de souris, aucune différence significative n'a été observée pour tous ces paramètres. L'anticorps chP3R99 ne modifie pas la quantité de cholestérol dans le sérum. Cela veut dire que l'effet anti-athérosclérotique du vaccin n'est pas causé par des effets hypocholestérolémians. Le vaccin utilise un autre mécanisme d'action que les traitements classiques de l'athérosclérose tels que les statines et les fibrates. Il faut savoir que chez l'humain, il est très rare que des lésions d'athérosclérose se forment à l'aorte. Par contre dans la littérature, la souris C57Bl/6 est un modèle de développement de lésions d'athérosclérose au niveau aortique. Il est ainsi plus facile de les quantifier dans cette région que dans les autres artères (Meir & Leitersdorf, 2004).

Une cascade d'anticorps anti-idiotypiques est induite chez les souris immunisées avec l'anticorps chP3R99. Afin de déterminer si le mécanisme d'action est lié à l'induction d'une réponse immunitaire chez les souris, nous avons caractérisé les anticorps sériques par la technique ELISA pour la caractérisation des anticorps. L'anticorps secondaire utilisé, couplé à la peroxydase, a révélé la présence d'anticorps sériques ayant une affinité pour le chP3R99 ou ayant une affinité envers les GAG. La théorie de la production d'une cascade d'anticorps anti-idiotypiques suppose que le système immunitaire produit des anticorps contre la partie variable des anticorps. Ainsi, l'injection de chP3R99 induit une production d'anticorps contre sa région variable. Par la suite, les anticorps anti-chP3R99 (anti-idiotype) induisent à leur tour chez la souris

la production d'anticorps contre leur région variable (anti-anti-idiotype) et ainsi de suite. La résultante de cette cascade est la présence dans le sérum de souris des anticorps qui sont anti-chP3R99 ou qui sont anti-GAG.

Le premier test d'ELISA effectué a permis de vérifier la présence d'anticorps anti-chP3R99 (Figure 10). De plus, les résultats ont montré que la réactivité du sérum envers le chP3R99 augmente par les doses injectées. Ainsi, on peut conclure à la présence d'un processus d'immunisation active en réponse à l'administration du chP3R99.

Nous avons vérifié que la fraction anti-idiotypique domine sur la fraction anti-isotypique. Lorsqu'on injecte le chP3R99 aux souris, la cascade anti-idiotypique suppose qu'il y aura une réponse immunitaire envers la partie variable de l'anticorps. Les AC3 produits copient la partie variable du chP3R99 et bloquent la liaison des LDL aux GAG produisant alors, un effet athéroprotecteur. Vu que la partie constante de l'anticorps chP3R99 ne bloque pas la rétention des LDL, il ne possède pas d'effet athéroprotecteur. C'est pourquoi, il est important de démontrer que la fraction anti-idiotypique domine sur la fraction anti-isotypique et que les anticorps générés ont des effets athéroprotecteurs. À cette fin, nous avons préincubé le sérum avec l'anticorps hR3. Cet anticorps pourra se lier au domaine constant (Fc) mais non au domaine variable. Ainsi l'incubation avec le sérum des souris immunisées avec le hR3 a pour effet de bloquer les anticorps de la fraction isotypique et de ne laisser que la fraction

anti-idiotypique. Par la suite, la réactivité du sérum non-incubé avec le hR3 et celle du sérum incubé avec le hR3 envers le chP3R99 ont été mesurées pour démontrer que la réactivité associée à la fraction d'anticorps anti-idiotypique est plus grande que la fraction d'anticorps anti-isotypique. La réactivité des sérums a été mesurée et démontre que l'incubation avec le hR3 bloque la fraction anti-isotypique. Il y a une différence significative entre la réactivité du sérum bloqué envers le chP3R99 et le sérum bloqué envers le hR3 ce qui confirme que la fraction idiotypique domine sur la fraction isotypique (Figure 11). Nous avons utilisé l'anticorps hR3 comme un contrôle négatif puisqu'il n'y a pas de cible chez la souris. L'anticorps hR3 est un anticorps anti-humain pour le récepteur du facteur de croissance épidermique (Mateo *et al.*, 1997).

Une seconde série de tests d'ELISA a été effectuée pour vérifier la présence d'anticorps anti-GAG dans le sérum de souris immunisées avec le vaccin (Figure 12). Les tests d'ELISA effectués pour les différents types de GAG dont l'héparine, le sulfate de chondroïtine et le sulfate de dermatane confirment la présence d'anticorps ayant une affinité pour ces différents types de GAG ainsi qu'une augmentation de la réactivité du sérum envers les GAG en fonction du nombre de doses injectées. L'injection de chP3R99 induit donc, tel que proposé dans notre hypothèse de recherche, une immunisation active et la génération d'une cascade d'anticorps anti-idiotypiques contre les différents types de GAG. En conséquence, les résultats démontrent que les souris sont capables de produire des anticorps contre les GAG même sans injection de GAG dans leur organisme. On peut donc conclure qu'il y a génération d'une cascade

d'anticorps anti-idiotypiques et que l'injection de l'anticorps chP3R99 immunise les souris contre les GAG.

## 2. L'anticorps chP3R99 est capable de se lier au niveau des lésions *in vivo*

Un de nos objectifs était de démontrer que les anticorps chP3R99 sont capables de se lier dans la lésion d'athérosclérose *in vivo*. Pour ce faire, nous avons utilisé un appareil de visualisation d'imagerie moléculaire Optix MX3 pour rongeurs. Cet appareil permet de détecter l'intensité de la fluorescence des marqueurs tels que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), couplé à la protéine à l'étude, après son injection dans la circulation sanguine d'une souris anesthésiée. Dans une première étude, le FITC était couplé à l'anticorps anti-VCAM, utilisé comme contrôle positif de la présence de lésions chez nos souris déficientes en apoE. Nous avons donc administré l'anti-VCAM à deux groupes expérimentaux non vaccinés avec le chP3R99. Nos résultats démontrent que les souris possèdent la même quantité de lésions (Figure 13 A1, A2 et A3). Des résultats de cette étude ont permis de montrer que l'anti-VCAM était complètement éliminé de la circulation sanguine une semaine après l'injection (résultats non montrés). Cinq jours plus tard après l'élimination du anti-VCAM, les souris ont été injectées avec soit le chP3R99-FITC ou le hR3-FITC. Lorsque l'on compare les souris du groupe 2, injectées avec du chP3R99-FITC aux souris du groupe 1, injectées au hR3-FITC, l'on constate que l'intensité de la fluorescence des souris du groupe 2 est significativement supérieure à celle du groupe 1. Le hR3-FITC

est un anticorps servant de contrôle négatif qui ne se lie pas aux GAG, l'intensité de sa fluorescence représente sa liaison à des sites non-spécifiques (Figure 15 B1, B2 et B3). Cette visualisation a été effectuée sur des souris vivantes pour bien établir que la liaison se fait in vivo.

Ces résultats montrent que les anticorps chP3R99 se lient à l'aorte. Cependant, notre intérêt était de démontrer que les anticorps chP3R99 se lient davantage au niveau des lésions, lorsque la surexpression de GAG dans les parois des artères est manifestée (Ross, 1999b). Nous avons utilisé deux groupes de souris; le groupe 2 étant des souris injectées avec du PBS ayant 20 % de lésions d'athérosclérose et le groupe 1 étant des souris vaccinées avec du chP3R99 ayant 12 % de lésions d'athérosclérose. Nous avons injecté le chP3R99-FITC aux deux groupes et le groupe 2, ayant le plus de lésions, a émis une fluorescence significativement supérieure au groupe 1. Ce résultat montre que la liaison du chP3R99 est augmentée dans les lésions d'athérosclérose (Figure 14).

Nous avons déterminé la cinétique d'élimination du chP3R99 de l'organisme. Après l'injection du chP3R99-FITC chez des souris apoE<sup>-/-</sup> de 10 semaines, l'intensité de la fluorescence, provenant de leur crosse aortique, a été mesurée sur différentes périodes de temps. Avec les différentes données de temps et d'intensité, il a été possible d'établir un graphique de la cinétique du chP3R99 dans l'organisme des souris. L'attachement du chP3R99-FITC aux lésions, via les GAG, est à son point maximal 57 heures après l'injection de l'anticorps et ce dernier est complètement éliminé de la circulation et de

l'organisme après 96 heures (Figure 15). Ce profil d'élimination est intéressant puisque son élimination s'effectue en 3 jours et que l'administration du chP3R99 dans nos protocoles était d'une semaine ou de deux semaines. Ceci permet de dresser l'hypothèse que se sont principalement les anticorps générés par la cascade d'anticorps anti-idiotypes qui bloquaient la rétention plutôt que les anticorps primaires.

Nous avons aussi étudié la population de macrophages se retrouvant dans la plaque d'athérosclérose afin de vérifier si le vaccin chP3R99 pouvait modifier le phénotype des macrophages dans les lésions. Lorsque l'anticorps chP3R99 et les anticorps générés par cascade anti-idiotypique se lient aux GAG, ils bloquent la rétention des LDL, ce qui diminue grandement la présence de LDLox dans la plaque et la chimiotaxie des monocytes dans les lésions. Dans les artères brachiocéphaliques des souris vaccinées avec le vaccin chP3R99, on observe une réduction de la population totale des macrophages marqués avec un anticorps anti-CD68 (Figure 16). Parmi les différents sous-types de population des macrophages, les macrophages M1 proviennent de la circulation et infiltrent les lésions sont ceux qui vont générer l'inflammation au niveau de celles-ci (Martinez *et al.*, 2008). On observe que les macrophages M1 qui infiltrent les lésions, marqués avec un anticorps anti-iNOS, sont diminués chez les souris injectées avec le vaccin (Figure 16). On peut donc en conclure que le vaccin au chP3R99 diminue la taille des lésions, mais diminue également la présence de macrophages inflammatoires dans celles-ci.

## **V.PERSPECTIVES**



Il a été démontré que le vaccin chP3R99 est capable de diminuer la taille des lésions d'athérosclérose et que son mécanisme d'action opère via une cascade d'anticorps anti-idiotypiques. Malgré ces excellents résultats, il reste quelques éléments à explorer.

Premièrement, malgré les deux différents protocoles, il n'a toujours pas été possible de déterminer l'espacement maximal entre les doses pour conserver la réponse immunitaire.

Deuxièmement, dans ce projet, les doses injectées ont toujours été de 50 µg/ml. Il serait intéressant de savoir si les quantités d'anticorps chP3R99 modifient les résultats. Puisqu'il a été décrit qu'il existait un plateau dans la production d'anticorps, il serait possible qu'une dose d'une quantité inférieure mais capable de générer une réponse qui atteints le plateau, produise une réduction des lésions similaire à la dose que nous injectons actuellement. Une autre possibilité serait qu'une dose plus grande pourrait générer une réponse plus rapide dans l'atteinte du plateau, ce qui procure la protection maximale plus tôt dans la vie de la souris. Une dose pourrait alors diminuer davantage les lésions.

Finalement, ce projet a principalement démontré les effets préventifs du vaccin chP3R99. Une possible limitation pour un potentiel vaccin chP3R99 serait son utilisation à des fins préventives uniquement. Il serait intéressant de vérifier si le vaccin possède des effets curatifs et si le vaccin est capable non seulement de prévenir les

lésions mais aussi de diminuer des lésions déjà présentes. Nous avons commencé à injecter les animaux à partir de leur 6<sup>e</sup> semaine bien avant que se forment les premières lésions. Les effets curatifs pourraient être vérifiés si nous débutons les injections de traitement plus tard dans la vie des souris c'est-à-dire après la formation des lésions.

## VI. CONCLUSION

Notre travail confirme les trois éléments de notre objectif de recherche. Le vaccin à base de chP3R99 réduit les lésions d'athérosclérose, la vaccination induit une cascade d'anticorps pouvant lier les GAG et, l'anticorps chP3R99 se lie au niveau des lésions d'athérosclérose *in vivo*.

Nos résultats montrent que la vaccination avec le chP3R99 possède un effet athéroprotecteur via la génération d'une cascade d'anticorps anti-idiotypiques qui interfèrent avec la liaison du LDL aux protéoglycanes, réduisant leur rétention dans l'espace sous-endothélial. De plus, avec la technique d'imagerie optique nous avons pu montrer que l'anticorps se lie dans les lésions athérosclérotiques chez les souris vivantes.

En conclusion, la vaccination active avec l'anticorps chP3R99 est une nouvelle approche thérapeutique prometteuse pour le traitement de l'athérosclérose.

## **VII. SOURCES DOCUMENTAIRES**

## Reference List

1. Anzinger, JJ, Chang, J, Xu, Q, Barthwal, MK, Bohnacker, T, Wymann, MP & Kruth, HS. (2012). Murine bone marrow-derived macrophages differentiated with GM-CSF become foam cells by PI3Kgamma-dependent fluid-phase pinocytosis of native LDL. *J Lipid Res*, **53**, 34-42.
2. Anzinger, JJ, Chang, J, Xu, Q, Buono, C, Li, Y, Leyva, FJ, Park, BC, Greene, LE & Kruth, HS. (2010). Native low-density lipoprotein uptake by macrophage colony-stimulating factor-differentiated human macrophages is mediated by macropinocytosis and micropinocytosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **30**, 2022-2031.
3. Barrett-Connor, E. (2009). Women and heart disease: neglected directions for future research. *J Cardiovasc Transl Res*, **2**, 256-257.
4. Barrett-Connor, E & Bush, TL. (1991). Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA*, **265**, 1861-1867.
5. Barter, PJ & Rye, KA. (2008). Is there a role for fibrates in the management of dyslipidemia in the metabolic syndrome? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **28**, 39-46.
6. Bierman, EL. (1992). George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb*, **12**, 647-656.
7. Binder, CJ, Horkko, S, Dewan, A, Chang, MK, Kieu, EP, Goodyear, CS, Shaw, PX, Palinski, W, Witztum, JL & Silverman, GJ. (2003). Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med*, **9**, 736-743.
8. Bloedon, LT, Dunbar, R, Duffy, D, Pinell-Salles, P, Norris, R, DeGroot, BJ, Movva, R, Navab, M, Fogelman, AM & Rader, DJ. (2008). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients. *J Lipid Res*, **49**, 1344-1352.
9. Boren, J, Olin, K, Lee, I, Chait, A, Wight, TN & Innerarity, TL. (1998). Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest*, **101**, 2658-2664.
10. Boring, L, Gosling, J, Cleary, M & Charo, IF. (1998). Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, **394**, 894-897.

11. Bouhlel, MA, Derudas, B, Rigamonti, E, Dievart, R, Brozek, J, Haulon, S, Zawadzki, C, Jude, B, Torpier, G, Marx, N, Staels, B & Chinetti-Gbaguidi, G. (2007). PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*, **6**, 137-143.
12. Bozeman, PM, Hoidal, JR & Shepherd, VL. (1988). Oxidant-mediated inhibition of ligand uptake by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem*, **263**, 1240-1247.
13. Bratzler, RL, Chisolm, GM, Colton, CK, Smith, KA & Lees, RS. (1977). The distribution of labeled low-density lipoproteins across the rabbit thoracic aorta in vivo. *Atherosclerosis*, **28**, 289-307.
14. Brewer, HB, Jr., Remaley, AT, Neufeld, EB, Basso, F & Joyce, C. (2004). Regulation of plasma high-density lipoprotein levels by the ABCA1 transporter and the emerging role of high-density lipoprotein in the treatment of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 1755-1760.
15. Brito, V, Mellal, K, Portelance, SG, Perez, A, Soto, Y, deBlois, D, Ong, H, Marleau, S & Vazquez, AM. (2012). Induction of anti-anti-idiotypic antibodies against sulfated glycosaminoglycans reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **32**, 2847-2854.
16. Brousseau, ME, Schaefer, EJ, Wolfe, ML, Bloedon, LT, Digenio, AG, Clark, RW, Mancuso, JP & Rader, DJ. (2004). Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med*, **350**, 1505-1515.
17. Burger-Kentischer, A, Gobel, H, Kleemann, R, Zerneck, A, Bucala, R, Leng, L, Finkelmeier, D, Geiger, G, Schaefer, HE, Schober, A, Weber, C, Brunner, H, Rutten, H, Ihling, C & Bernhagen, J. (2006). Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Atherosclerosis*, **184**, 28-38.
18. Camejo, G, Hurt-Camejo, E, Wiklund, O & Bondjers, G. (1998). Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis*, **139**, 205-222.
19. Chan, L. (1992). Apolipoprotein B, the major protein component of triglyceride-rich and low density lipoproteins. *J Biol Chem*, **267**, 25621-25624.
20. Cooke, JP & Tsao, PS. (1994). Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler Thromb*, **14**, 653-655.
21. Cowie, CC, Rust, KF, Byrd-Holt, DD, Eberhardt, MS, Flegal, KM, Engelgau, MM, Saydah, SH, Williams, DE, Geiss, LS & Gregg, EW. (2006). Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in adults in the U.S. population:

National Health And Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Diabetes Care*, **29**, 1263-1268.

22. Curmi, PA, Juan, L & Tedgui, A. (1990). Effect of transmural pressure on low density lipoprotein and albumin transport and distribution across the intact arterial wall. *Circ Res*, **66**, 1692-1702.
23. Cybulsky, MI, Iiyama, K, Li, H, Zhu, S, Chen, M, Iiyama, M, Davis, V, Gutierrez-Ramos, JC, Connelly, PW & Milstone, DS. (2001). A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*, **107**, 1255-1262.
24. Daugherty, A, Dunn, JL, Rateri, DL & Heinecke, JW. (1994). Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, **94**, 437-444.
25. Davenport, P & Tipping, PG. (2003). The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol*, **163**, 1117-1125.
26. de Boer, OJ, van Der Wal, AC, Houtkamp, MA, Ossewaarde, JM, Teeling, P & Becker, AE. (2000). Unstable atherosclerotic plaques contain T-cells that respond to *Chlamydia pneumoniae*. *Cardiovasc Res*, **48**, 402-408.
27. de Grooth, GJ, Kuivenhoven, JA, Stalenhoef, AF, de, GJ, Zwinderman, AH, Pasma, JL, van, TA & Kastelein, JJ. (2002). Efficacy and safety of a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, JTT-705, in humans: a randomized phase II dose-response study. *Circulation*, **105**, 2159-2165.
28. de Jager, SC & Kuiper, J. (2011). Vaccination strategies in atherosclerosis. *Thromb Haemost*, **106**, 796-803.
29. Dinarello, CA. (2000). The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med*, **343**, 732-734.
30. Edfeldt, K, Swedenborg, J, Hansson, GK & Yan, ZQ. (2002). Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation*, **105**, 1158-1161.
31. Falk, LA & Vogel, SN. (1988). Comparison of bone marrow progenitors responsive to granulocyte-macrophage colony stimulating factor and macrophage colony stimulating factor-1. *J Leukoc Biol*, **43**, 148-157.
32. Febbraio, M, Podrez, EA, Smith, JD, Hajjar, DP, Hazen, SL, Hoff, HF, Sharma, K & Silverstein, RL. (2000a). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*, **105**, 1049-1056.



33. Febbraio, M, Podrez, EA, Smith, JD, Hajjar, DP, Hazen, SL, Hoff, HF, Sharma, K & Silverstein, RL. (2000b). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*, **105**, 1049-1056.
34. Fernandez-Marrero, Y, Hernandez, T, Roque-Navarro, L, Talavera, A, Moreno, E, Grinan, T, Vazquez, AM, de Acosta, CM, Perez, R & Lopez-Requena, A. (2011). Switching on cytotoxicity by a single mutation at the heavy chain variable region of an anti-ganglioside antibody. *Mol Immunol*, **48**, 1059-1067.
35. Fogelman, AM, Haberland, ME, Seager, J, Hokom, M & Edwards, PA. (1981). Factors regulating the activities of the low density lipoprotein receptor and the scavenger receptor on human monocyte-macrophages. *J Lipid Res*, **22**, 1131-1141.
36. Fredrikson, GN, Soderberg, I, Lindholm, M, Dimayuga, P, Chyu, KY, Shah, PK & Nilsson, J. (2003). Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 879-884.
37. Friedewald, WT, Levy, RI & Fredrickson, DS. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, **18**, 499-502.
38. Galis, ZS, Sukhova, GK, Lark, MW & Libby, P. (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, **94**, 2493-2503.
39. Glass, CK & Witztum, JL. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, **104**, 503-516.
40. Goldstein, JL & Brown, MS. (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*, **46**, 897-930.
41. Gould, AL, Rossouw, JE, Santanello, NC, Heyse, JF & Furberg, CD. (1998). Cholesterol reduction yields clinical benefit: impact of statin trials. *Circulation*, **97**, 946-952.
42. Gurfinkel, EP, de la Fuente, RL, Mendiz, O & Mautner, B. (2002). Influenza vaccine pilot study in acute coronary syndromes and planned percutaneous coronary interventions: the FLU Vaccination Acute Coronary Syndromes (FLUVACS) Study. *Circulation*, **105**, 2143-2147.
43. Hansson, GK. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, **352**, 1685-1695.

44. Hansson, GK. (2009). Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *J Thromb Haemost*, **7 Suppl 1**, 328-331.
45. Hansson, GK, Robertson, AK & Soderberg-Naucler, C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*, **1**, 297-329.
46. Harb, D, Bujold, K, Febbraio, M, Sirois, MG, Ong, H & Marleau, S. (2009). The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation. *Cardiovasc Res*, **83**, 42-51.
47. Hulley, S, Grady, D, Bush, T, Furberg, C, Herrington, D, Riggs, B & Vittinghoff, E. (1998). Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA*, **280**, 605-613.
48. Hurt-Camejo, E, Olsson, U, Wiklund, O, Bondjers, G & Camejo, G. (1997). Cellular consequences of the association of apoB lipoproteins with proteoglycans. Potential contribution to atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 1011-1017.
49. Kairemo, KJ, Lappalainen, AK, Kaapa, E, Laitinen, OM, Hyytinen, T, Karonen, SL & Gronblad, M. (2001). In vivo detection of intervertebral disk injury using a radiolabeled monoclonal antibody against keratan sulfate. *J Nucl Med*, **42**, 476-482.
50. Kannel, WB, Castelli, WP, Gordon, T & McNamara, PM. (1971). Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Ann Intern Med*, **74**, 1-12.
51. Kao, CH, Chen, JK & Yang, VC. (1994). Ultrastructure and permeability of endothelial cells in branched regions of rat arteries. *Atherosclerosis*, **105**, 97-114.
52. Kastelein, JJ, van Leuven, SI, Burgess, L, Evans, GW, Kuivenhoven, JA, Barter, PJ, Revkin, JH, Grobbee, DE, Riley, WA, Shear, CL, Duggan, WT & Bots, ML. (2007). Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*, **356**, 1620-1630.
53. Katusic, ZS. (2001). Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **281**, H981-H986.
54. Khalil, MF, Wagner, WD & Goldberg, IJ. (2004). Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 2211-2218.

55. Kirii, H, Niwa, T, Yamada, Y, Wada, H, Saito, K, Iwakura, Y, Asano, M, Moriwaki, H & Seishima, M. (2003). Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 656-660.
56. Kleemann, R, Zadelaar, S & Kooistra, T. (2008). Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*, **79**, 360-376.
57. Krieger, M. (1997). The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol*, **8**, 275-280.
58. Kruth, HS, Jones, NL, Huang, W, Zhao, B, Ishii, I, Chang, J, Combs, CA, Malide, D & Zhang, WY. (2005). Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J Biol Chem*, **280**, 2352-2360.
59. Kuchibhotla, S, Vanegas, D, Kennedy, DJ, Guy, E, Nimako, G, Morton, RE & Febbraio, M. (2008). Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res*, **78**, 185-196.
60. Kume, N, Cybulsky, MI & Gimbrone, MA, Jr. (1992). Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest*, **90**, 1138-1144.
61. Kwiterovich, PO, Jr. (1998). The antiatherogenic role of high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol*, **82**, 13Q-21Q.
62. Libby, P, Egan, D & Skarlatos, S. (1997). Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation*, **96**, 4095-4103.
63. Lloyd-Jones, D, Adams, RJ, Brown, TM, Carnethon, M, Dai, S, de, SG, Ferguson, TB, Ford, E, Furie, K, Gillespie, C, Go, A, Greenlund, K, Haase, N, Hailpern, S, Ho, PM, Howard, V, Kissela, B, Kittner, S, Lackland, D, Lisabeth, L, Marelli, A, McDermott, MM, Meigs, J, Mozaffarian, D, Mussolino, M, Nichol, G, Roger, VL, Rosamond, W, Sacco, R, Sorlie, P, Stafford, R, Thom, T, Wasserthiel-Smoller, S, Wong, ND & Wylie-Rosett, J. (2010). Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, **121**, 948-954.
64. Lopez-Requena, A, Bestagno, M, Mateo de, AC, Cesco-Gaspere, M, Vazquez, AM, Perez, R & Burrone, OR. (2007). Gangliosides, Ab1 and Ab2 antibodies III. The idiotype of anti-ganglioside mAb P3 is immunogenic in a T cell-dependent manner. *Mol Immunol*, **44**, 2915-2922.

65. Lopez-Requena, A, Mateo de, AC, Perez, A, Valle, A, Lombardero, J, Sosa, K, Perez, R & Vazquez, AM. (2003). Chimeric anti-N-glycolyl-ganglioside and its anti-idiotypic MAbs: immunodominance of their variable regions. *Hybrid Hybridomics*, **22**, 235-243.
66. Manning-Tobin, JJ, Moore, KJ, Seimon, TA, Bell, SA, Sharuk, M, Alvarez-Leite, JI, de Winther, MP, Tabas, I & Freeman, MW. (2009). Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, 19-26.
67. Mantovani, A, Garlanda, C & Locati, M. (2009). Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, 1419-1423.
68. Mantovani, A, Sica, A & Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity*, **23**, 344-346.
69. Marlin, SD & Springer, TA. (1987). Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell*, **51**, 813-819.
70. Mateo, C, Moreno, E, Amour, K, Lombardero, J, Harris, W & Perez, R. (1997). Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology*, **3**, 71-81.
71. Meir, KS & Leitersdorf, E. (2004). Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 1006-1014.
72. Miller, GJ & Miller, NE. (1975). Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet*, **1**, 16-19.
73. Moreno, E, Lanne, B, Vazquez, AM, Kawashima, I, Tai, T, Fernandez, LE, Karlsson, KA, Angstrom, J & Perez, R. (1998). Delineation of the epitope recognized by an antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides. *Glycobiology*, **8**, 695-705.
74. Nakashima, Y, Plump, AS, Raines, EW, Breslow, JL & Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, **14**, 133-140.
75. Napoli, C, D'Armiento, FP, Mancini, FP, Postiglione, A, Witztum, JL, Palumbo, G & Palinski, W. (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal

accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, **100**, 2680-2690.

76. Napoli, C, Glass, CK, Witztum, JL, Deutsch, R, D'Armiento, FP & Palinski, W. (1999). Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet*, **354**, 1234-1241.
77. Navab, M, Anantharamaiah, GM, Reddy, ST & Fogelman, AM. (2006). Apolipoprotein A-I mimetic peptides and their role in atherosclerosis prevention. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, **3**, 540-547.
78. Nielsen, LB, Stender, S, Kjeldsen, K & Nordestgaard, BG. (1994). Effect of angiotensin II and enalapril on transfer of low-density lipoprotein into aortic intima in rabbits. *Circ Res*, **75**, 63-69.
79. Nissen, SE, Tardif, JC, Nicholls, SJ, Revkin, JH, Shear, CL, Duggan, WT, Ruzyllo, W, Bachinsky, WB, Lasala, GP & Tuzcu, EM. (2007). Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med*, **356**, 1304-1316.
80. Nozaki, S, Kashiwagi, H, Yamashita, S, Nakagawa, T, Kostner, B, Tomiyama, Y, Nakata, A, Ishigami, M, Miyagawa, J, Kameda-Takemura, K & . (1995). Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J Clin Invest*, **96**, 1859-1865.
81. Pal, S, Saha, A, Mohanty, K, Mallick, P, Chatterjee, SK, Foon, KA & Bhattacharya-Chatterjee, M. (2007). Generation of Her-2/neu vaccine utilizing idiotypic network cascade. *Cancer Biol Ther*, **6**, 1916-1925.
82. Palinski, W, Rosenfeld, ME, Yla-Herttuala, S, Gurtner, GC, Socher, SS, Butler, SW, Parthasarathy, S, Carew, TE, Steinberg, D & Witztum, JL. (1989). Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 1372-1376.
83. Pedersen, TR, Kjerkshus, J, Berg, K, Haghfelt, T, Faergeman, O, Faergeman, G, Pyorala, K, Miettinen, T, Wilhelmsen, L, Olsson, AG & Wedel, H. (2004). Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). 1994. *Atheroscler Suppl*, **5**, 81-87.
84. Portman, OW, O'Malley, JP & Alexander, M. (1987). Metabolism of native and acetylated low density lipoproteins in squirrel monkeys with emphasis on aortas with varying severities of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **66**, 227-235.

85. Prochaska, JJ & Hilton, JF. (2012). Risk of cardiovascular serious adverse events associated with varenicline use for tobacco cessation: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, **344**, e2856.
86. Rader, DJ. (2006). Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest*, **116**, 3090-3100.
87. Rajavashisth, T, Qiao, JH, Tripathi, S, Tripathi, J, Mishra, N, Hua, M, Wang, XP, Loussararian, A, Clinton, S, Libby, P & Lusis, A. (1998). Heterozygous osteopetrotic (op) mutation reduces atherosclerosis in LDL receptor- deficient mice. *J Clin Invest*, **101**, 2702-2710.
88. Reichert, TA, Simonsen, L, Sharma, A, Pardo, SA, Fedson, DS & Miller, MA. (2004). Influenza and the winter increase in mortality in the United States, 1959-1999. *Am J Epidemiol*, **160**, 492-502.
89. Richter, PH. (1975). A network theory of the immune system. *Eur J Immunol*, **5**, 350-354.
90. Robertson, AK & Hansson, GK. (2006). T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 2421-2432.
91. Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, **340**, 115-126.
92. Sans, E, Delachanal, E & Duperray, A. (2001). Analysis of the roles of ICAM-1 in neutrophil transmigration using a reconstituted mammalian cell expression model: implication of ICAM-1 cytoplasmic domain and Rho-dependent signaling pathway. *J Immunol*, **166**, 544-551.
93. Schenkel, AR, Mamdouh, Z & Muller, WA. (2004). Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol*, **5**, 393-400.
94. Schwartz, SM, Galis, ZS, Rosenfeld, ME & Falk, E. (2007). Plaque rupture in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 705-713.
95. Schwenke, DC & Carew, TE. (1989a). Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis*, **9**, 908-918.
96. Schwenke, DC & Carew, TE. (1989b). Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis*, **9**, 908-918.
97. Segatori, VI, Vazquez, AM, Gomez, DE, Gabri, MR & Alonso, DF. (2012). Preclinical evaluation of racotumomab, an anti-idiotypic monoclonal antibody

- to N-glycolyl-containing gangliosides, with or without chemotherapy in a mouse model of non-small cell lung cancer. *Front Oncol*, **2**, 160.
98. Seimon, TA, Obstfeld, A, Moore, KJ, Golenbock, DT & Tabas, I. (2006). Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 19794-19799.
  99. Shah, A, Rader, DJ & Millar, JS. (2010). The effect of PPAR-alpha agonism on apolipoprotein metabolism in humans. *Atherosclerosis*, **210**, 35-40.
  100. Shah, PK, Falk, E, Badimon, JJ, Fernandez-Ortiz, A, Mailhac, A, Villareal-Levy, G, Fallon, JT, Regnstrom, J & Fuster, V. (1995). Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation*, **92**, 1565-1569.
  101. Shepherd, J, Cobbe, SM, Ford, I, Isles, CG, Lorimer, AR, Macfarlane, PW, McKillop, JH & Packard, CJ. (1995). Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*, **333**, 1301-1307.
  102. Skalen, K, Gustafsson, M, Rydberg, EK, Hulten, LM, Wiklund, O, Innerarity, TL & Boren, J. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, **417**, 750-754.
  103. Smith, JD, Trogan, E, Ginsberg, M, Grigaux, C, Tian, J & Miyata, M. (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8264-8268.
  104. Sparrow, CP, Parthasarathy, S & Steinberg, D. (1989). A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem*, **264**, 2599-2604.
  105. Stary, HC, Chandler, AB, Glagov, S, Guyton, JR, Insull, W, Jr., Rosenfeld, ME, Schaffer, SA, Schwartz, CJ, Wagner, WD & Wissler, RW. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, **89**, 2462-2478.
  106. Stein, O, Stein, Y & Eisenberg, S. (1973). A radioautographic study of the transport of <sup>125</sup>I-labeled serum lipoproteins in rat aorta. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, **138**, 223-237.

107. Steinberg, D & Witztum, JL. (2002). Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation*, **105**, 2107-2111.
108. Stocker, R & Keaney, JF, Jr. (2004a). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, **84**, 1381-1478.
109. Stocker, R & Keaney, JF, Jr. (2004b). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, **84**, 1381-1478.
110. Sugiyama, S, Okada, Y, Sukhova, GK, Virmani, R, Heinecke, JW & Libby, P. (2001). Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol*, **158**, 879-891.
111. Tabas, I. (2005). Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 2255-2264.
112. Tabas, I, Li, Y, Brocia, RW, Xu, SW, Swenson, TL & Williams, KJ. (1993). Lipoprotein lipase and sphingomyelinase synergistically enhance the association of atherogenic lipoproteins with smooth muscle cells and extracellular matrix. A possible mechanism for low density lipoprotein and lipoprotein(a) retention and macrophage foam cell formation. *J Biol Chem*, **268**, 20419-20432.
113. Tannock, LR & King, VL. (2008). Proteoglycan mediated lipoprotein retention: a mechanism of diabetic atherosclerosis. *Rev Endocr Metab Disord*, **9**, 289-300.
114. Territo, M, Berliner, JA & Fogelman, AM. (1984). Effect of monocyte migration on low density lipoprotein transport across aortic endothelial cell monolayers. *J Clin Invest*, **74**, 2279-2284.
115. van, WS, van den Berk, N, van Buul, JD, Mul, FP, Lommerse, I, Mous, R, ten Klooster, JP, Zwaginga, JJ & Hordijk, PL. (2003). VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am J Physiol Cell Physiol*, **285**, C343-C352.
116. Vazquez, AM, Alfonso, M, Lanne, B, Karlsson, KA, Carr, A, Barroso, O, Fernandez, LE, Rengifo, E, Lanio, ME, Alvarez, C & . (1995). Generation of a murine monoclonal antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids. *Hybridoma*, **14**, 551-556.
117. Vazquez, AM, Perez, A, Hernandez, AM, Macias, A, Alfonso, M, Bombino, G & Perez, R. (1998). Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody. *Hybridoma*, **17**, 527-534.



118. Weinbaum, S, Tzeghai, G, Ganatos, P, Pfeffer, R & Chien, S. (1985). Effect of cell turnover and leaky junctions on arterial macromolecular transport. *Am J Physiol*, **248**, H945-H960.
119. Whitman, SC, Ravisankar, P & Daugherty, A. (2002). IFN-gamma deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice. *J Interferon Cytokine Res*, **22**, 661-670.
120. Wiklund, O, Carew, TE & Steinberg, D. (1985). Role of the low density lipoprotein receptor in penetration of low density lipoprotein into rabbit aortic wall. *Arteriosclerosis*, **5**, 135-141.
121. Wilcox, JN, Smith, KM, Schwartz, SM & Gordon, D. (1989). Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2839-2843.
122. Williams, KJ. (2001). Arterial wall chondroitin sulfate proteoglycans: diverse molecules with distinct roles in lipoprotein retention and atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*, **12**, 477-487.
123. Wilson, PW, D'Agostino, RB, Levy, D, Belanger, AM, Silbershatz, H & Kannel, WB. (1998). Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*, **97**, 1837-1847.
124. Wyler von, BM, Dubler, D, Mirlacher, M, Cathomas, G, Muser, J & Biedermann, BC. (2006). Increased apolipoprotein deposits in early atherosclerotic lesions distinguish symptomatic from asymptomatic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 359-364.
125. Yusuf, S, Reddy, S, Ounpuu, S & Anand, S. (2001). Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation*, **104**, 2746-2753.
126. Zeiher, AM, Goebel, H, Schachinger, V & Ihling, C. (1995). Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation*, **91**, 941-947.
127. Kindt, Thomas J.; Goldsby, Richard A.; Osborne, Barbara A., (2007) Immunologie, Le cours de Janis Kuby avec questions de révision, Paris: Dunod, 684 p.
128. Institut de la statistique du Québec (2011). «Décès et taux de mortalité selon la cause et le sexe, Québec, 2008», sur le site Institut de la statistique du Québec. Consulté le 25 juin 2012.

[http://www.stat.gouv.qc.ca/donstat/societe/demographie/naisn\\_deces/310\\_2008\\_tousages.htm](http://www.stat.gouv.qc.ca/donstat/societe/demographie/naisn_deces/310_2008_tousages.htm)

129. Institut national de la santé publique du Québec (2012). «Prévalence du diabète au Québec et dans ses régions: première estimations d'après les fichiers administratifs», sur le site de l'Institut nationale de la santé publique du Québec. Consulté le 25 juin 2012.  
[http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/106\\_PrevalenceDiabete.pdf](http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/106_PrevalenceDiabete.pdf)
130. English JP, Willius FA, and Berkse NJ. (1940) Tobacco and coronary disease, JAMA The Journal of the American Medical Association