

Mémoire de Maîtrise en médecine humaine
Faculté de biologie et de médecine, Ecole de médecine
Université de Lausanne

**Production et évaluation de l'anticorps NIMP-R14 pour dépléter
chroniquement les neutrophiles chez un modèle expérimental
d'athérosclérose avancée : la souris ApoE^{-/-} 2 reins-1clip (2K1C)**

Service d'angiologie
Centre Hospitalier Universitaire Vaudois
Lausanne

Etudiant

Ahmad Mehdi Azizi

Tuteur

Professeur Lucia Mazzolai
Service d'angiologie, CHUV, Lausanne

Co-tuteur

Dr Maxime Pellegrin
Service d'angiologie, CHUV, Lausanne

Expert

Professeur Michel Duchosal
Service d'hématologie, CHUV, Lausanne

2012-2013

Remerciements:

Je souhaite commencer ce travail par ces quelques mots afin de remercier toute l'équipe du laboratoire du service d'angiologie. Tout d'abord, un grand merci à mon co-tuteur, le Dr Maxime Pellegrin pour sa patience, son dévouement, ses précieux conseils et surtout sa grande disponibilité. Je tiens aussi à remercier ma tutrice, la Professeure Lucia Mazzolai pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche en laboratoire ainsi que pour m'avoir fait apprécier l'angiologie. Merci également à Karima Bouzourène et à Jean-François Aubert qui ont fait preuve de beaucoup de patience pour me guider lors de mes premiers pas dans la recherche. Enfin, je tiens à remercier le Professeur Michel Duchosal pour avoir accepté d'expertiser mon travail.

Mots clés pour l'archivage sur SERVAL :

- Athérosclérose
- Neutrophiles
- Angiotensine II
- Apoe -/- 2K1C

Table des matières

1. INTRODUCTION

2. NEUTROPHILES ET ATHEROSCLEROSE

2.1. Les granulocytes neutrophiles : généralités

2.2. Athérosclérose : physiopathologie

2.3. Plaque stable, plaque vulnérable et angiotensine II

2.4. Neutrophiles et athérosclérose : état de la littérature

3. OBJECTIFS DU MEMOIRE

4. MATERIELS ET METHODES

4.1. Animaux

4.2. Production de l'anticorps NIMP-R14

4.2.1. Hybridome

4.2.2. Protocole

4.3. Evaluation de l'efficacité de l'anticorps NIMP-R14

4.3.1. Injection de l'anticorps chez la souris

4.3.2. Prise de sang

4.3.3. Marquage direct des neutrophiles

4.3.4. Analyse par cytométrie de flux

4.4. Analyse statistique

5. ETUDE DE LA DEPLETION ET DE LA RECONSTITUTION DES NEUTROPHILES

5.1. Expérience n°1

5.2. Expérience n°2

5.3. Expérience n°3

6. DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

7. REFERENCES

8. ANNEXES

1. INTRODUCTION

L'athérosclérose (ATS) est une maladie artérielle inflammatoire chronique à l'origine des nombreuses maladies cardiovasculaires que sont l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral ou encore l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs. L'ATS se définit comme la formation de plaques fibro-lipidiques dans l'intima des artères. Les facteurs de risque majeurs associés à l'ATS sont l'hypertension, l'hypercholestérolémie, le tabagisme, le diabète, la sédentarité, ou encore des prédispositions génétiques. L'ATS peut être asymptomatique durant des années ou alors engendrer des complications aiguës pouvant parfois mettre le pronostic vital en jeu. Les complications les plus graves surviennent principalement lors de la rupture d'une plaque athéromateuse dite vulnérable ou instable. En effet, cette dernière peut se rompre et entraîner la formation d'un thrombus artériel occlusif avec, pour conséquence, l'ischémie/nécrose des tissus en aval. Prévenir le développement de la plaque vulnérable et/ou la « stabiliser » permettrait donc de prévenir les complications cliniques de l'ATS. Cet objectif requiert une connaissance éclairée des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la physiopathologie de l'ATS et de la plaque vulnérable.

Les travaux expérimentaux menés au sein du laboratoire du service d'angiologie du CHUV sous la direction du Prof. Lucia Mazzolai ont montré que l'angiotensine II (ang II), produit final de la cascade du système rénine-angiotensine, joue un rôle majeur dans la « vulnérabilité » des plaques athéromateuses (1). Ces travaux ont été réalisés à partir d'un modèle animal original développant des plaques d'ATS vulnérables dépendantes de l'ang II: la souris ApoE^{-/-} 2 reins-1 clip (2K1C). Plus récemment, le laboratoire d'angiologie a mis en évidence une implication directe des leucocytes, plus précisément des macrophages et des lymphocytes T CD4⁺, dans l'athérogenèse ang II-dépendante (2,3). Dernièrement, des travaux ont également suggéré un rôle possible des granulocytes neutrophiles dans l'ATS (4,5,6,7). Toutefois, les études sont encore limitées de sorte que le rôle exact des neutrophiles dans l'ATS et plus spécialement dans l'ATS induite par l'ang II reste à démontrer.

Une des recherches actuelles menée dans le laboratoire est donc d'étudier le rôle des neutrophiles dans le développement de la plaque athéromateuse vulnérable à partir du modèle animal, la souris ApoE^{-/-} 2K1C.

Pour évaluer le rôle direct des neutrophiles chez notre modèle animal, nous avons choisi comme méthode la déplétion des neutrophiles circulants par l'utilisation d'un anticorps spécifique. Il a été reporté dans la littérature que l'anticorps monoclonal NIMP-R14

permettait de dépléter sélectivement *in vivo* les neutrophiles dans différents modèles murins (8,9). Cependant, ces études ont utilisé cet anticorps anti-neutrophiles majoritairement sur des périodes expérimentales de durées relativement limitées (12-14 jours) et la question s'est donc posée de savoir si cet anticorps pouvait aussi dépléter les neutrophiles chez notre modèle animal, qui requiert une période expérimentale de 4 semaines pour développer des plaques vulnérables (1).

Le but de ce travail a donc été de produire l'anticorps NIMP-R14 et d'évaluer son efficacité chez la souris ApoE^{-/-} 2K1C qui développe des plaques d'ATS vulnérables dépendantes de l'ang II.

2. NEUTROPHILES ET ATHEROSCLEROSE

2.1. Les granulocytes neutrophiles : généralités

Les granulocytes neutrophiles ou polynucléaires neutrophiles sont des cellules du système immunitaire inné, formés dans la moelle osseuse, qui forment la première ligne de défense du corps contre les pathogènes. Ces cellules sont caractérisées par un noyau polylobé (d'où le nom de polynucléaire) et de nombreuses granules cytoplasmiques (**Figure 1**). Dans le sang humain, ce sont les leucocytes les plus abondants et représentent environ 60-70% du nombre total de ces derniers (10).

Les neutrophiles ont un diamètre de 10-12 μm et ont une durée de vie de 8-12 h dans le sang mais peuvent survivre beaucoup plus longtemps sur le site d'une inflammation.

Les granulocytes neutrophiles jouent un rôle important dans l'inflammation et la réponse immunitaire innée.

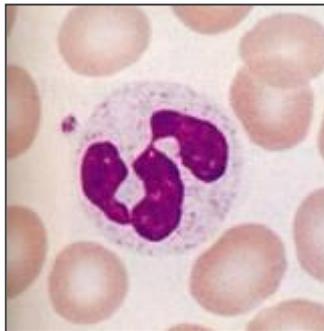


Figure 1. Un granulocyte neutrophile entouré d'érythrocytes. Le granulocyte se caractérise par un noyau polylobé ainsi que des granules dans le cytoplasme.

Les neutrophiles dérivent des cellules souches hématopoïétiques qui, suite à une série de différenciations, vont donner les cellules de la lignée myéloïde puis plus spécifiquement celle des granulocytes dont font partie les neutrophiles. Ces différenciations se font sous l'influence de nombreux facteurs de croissance comme le GM-CSF (granulocytes macrophage-colony stimulating factor), le G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) ou encore les interleukines IL-3 et IL-6 sécrétées par d'autres types de cellules (macrophages, cellules endothéliales, fibroblastes etc...). Les granulocytes ainsi arrivés à maturité sont ensuite libérés dans le sang (10).

Le neutrophile parvient à remplir son rôle dans l'immunité innée grâce à plusieurs procédés. La migration est une des fonctions principales des neutrophiles qui ont donc la faculté de se

déplacer hors des vaisseaux sanguins pour atteindre le lieu de l'inflammation. Cette migration « dirigée » se déroule en plusieurs étapes. Dans les conditions physiologiques normales, les granulocytes roulent le long de l'endothélium sous l'action du courant sanguin (« rolling ») et adhèrent donc faiblement à la paroi vasculaire. Au contraire, lors de l'inflammation, les produits bactériens ainsi que d'autres cytokines comme le TNF- α (tumor necrosis factor- α) stimulent la production de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, notamment l'E-selectin et ICAM-1s (intercellular adhesion molecule-1). Lorsqu'un neutrophile entre en contact fortuitement avec l'endothélium, ses protéines de surface appelées PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) et L-selectin se lient aux molécules d'adhésion ce qui conduit à l'attachement du neutrophile à la paroi artérielle et à son « rolling » sur l'endothélium. Il s'en suit une activation des intégrines β 2 présentes également à la surface du neutrophile qui vont conduire à son adhésion sur l'endothélium (11). Finalement, le neutrophile réorganise son cytosquelette afin de migrer entre les cellules endothéliales et rejoindre ainsi le site de l'inflammation où il va éliminer les bactéries, virus et autres particules étrangères en les ingérant (phagocytose). Pour ce faire, le neutrophile possède des récepteurs à lipopolysaccharides et polysaccharides, entre autres, permettant de reconnaître les antigènes pathogènes (12). L'ingestion du pathogène à l'intérieur du neutrophile débute avec la formation du phagosome dans lequel est emprisonnée la particule étrangère par invagination de la membrane cytoplasmique (11,13). L'agent pathogène phagocyté est finalement enfermé dans le phagosome, où il va être dégradé totalement. Pour cela, les nombreuses granules qu'il contient vont fusionner avec le phagosome et libérer ainsi leur contenu à l'intérieur de celui-ci. Il existe plusieurs sortes de granules dans les neutrophiles (**Figure 2**) :

- Les granules azurophiles ou primaires: elles sont grandes et peu nombreuses, contiennent des agents anti-microbiens (surtout des myéloperoxydases (MPO), mais aussi des défensines, lysozymes, élastases, protéinases etc...).
- Les granules spécifiques ou secondaires: ces granules ne contiennent pas de MPO, mais sont caractérisées par la présence de lactoferrines en plus d'autres molécules cytotoxiques telles que des phosphatases alcalines, lysozymes, NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxydases etc...
- Les granules tertiaires contiennent quant à elles des métalloprotéinases (11,14).

En plus de ces granules, les neutrophiles contiennent des vésicules sécrétoires aidant aussi la cellule dans sa fonction de défense immunitaire grâce à leur contenu en CR1 (complement receptor 1), métalloprotéinases, ou encore DAF (decay accelerating factor) (14).

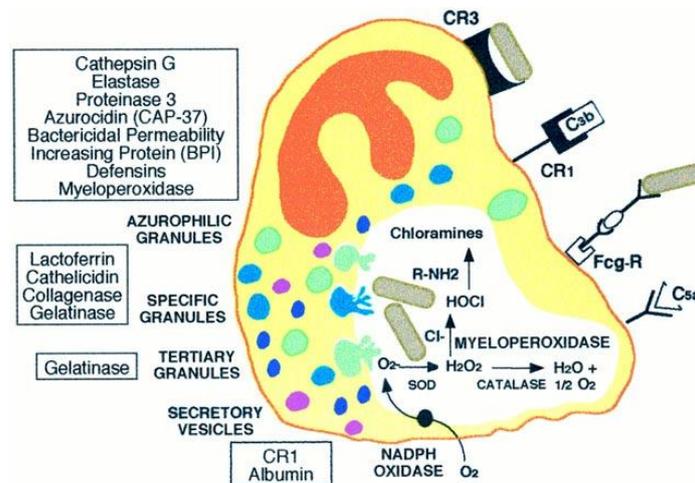


Figure 2. Représentation d'un neutrophile avec ses récepteurs et ses différentes granules (15).

2.2. Athérosclérose : physiopathologie

L'ATS est à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires, qui sont elles-mêmes la première cause de mortalité dans le monde (16,17). L'ATS est une maladie chronique et inflammatoire des artères de gros et moyens calibres. Elle est caractérisée par la formation de plaques consistant en une agglomération dans la paroi artérielle de lipides, de tissus fibreux, de cellules immunitaires et cellules musculaires lisses (CML), entraînant progressivement un rétrécissement partiel de la lumière des artères affectées (sténose artérielle). La sténose artérielle entraîne généralement une diminution de la perfusion des organes en aval avec des conséquences cliniques. Par exemple, l'angine de poitrine, qui se caractérise par une douleur rétro-sternale (ischémie myocardique), est généralement secondaire à une sténose coronarienne. De même, une sténose au niveau des artères des membres inférieurs provoque une douleur survenant tout d'abord à l'effort (ischémie musculaire) obligeant le patient à stopper son effort (claudication intermittente) (18).

Cependant, plus que la diminution de la lumière vasculaire, c'est surtout le phénotype des plaques qui détermine leur dangerosité (cf paragraphe suivant). En effet, les plaques vulnérables peuvent se rompre et former des thrombus pouvant obstruer totalement la lumière artérielle et provoquer ainsi des complications aiguës bien connues comme l'infarctus du

myocarde lors de l'obstruction des artères coronaires ou encore l'accident vasculaire cérébral en cas d'obstruction des artères cérébrales ou carotidiennes. Cependant, malgré des complications locales (parfois mortelles), l'ATS est une maladie systémique caractérisée par la formation de plaques à différents niveaux du système artériel. Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés et se divisent en deux groupes : les facteurs de risque modifiables pour la plupart liés au mode de vie, comme l'hypertension artérielle, l'obésité, le diabète, le tabac, l'hypercholestérolémie, la sédentarité, et les facteurs de risque non modifiables tels que l'âge, le sexe, la génétique ou encore l'histoire familiale.

La physiopathologie de l'ATS est complexe et encore incomplètement connue. De ce fait, seules les principales étapes de l'athérogenèse sont décrites dans ce travail.

De manière simplifiée, la formation de la plaque athéromateuse se fait en plusieurs étapes : l'infiltration des LDL (low density lipoprotein)-cholestérol dans l'intima des artères, le recrutement et l'activation des leucocytes qui vont déclencher la réaction inflammatoire, la formation des cellules spumeuses, et enfin la progression des plaques (19).

L'endothélium, interface entre le sang et la paroi artérielle, constitue un élément clé dans le développement de l'ATS. Dans les conditions physiologiques normales, l'endothélium joue le rôle d'un filtre sélectif, participe au contrôle de la vasomotricité et possède différentes fonctions, notamment anti-adhésion cellulaire, anti-coagulante, anti-fibrinolytique etc... Cependant, les facteurs de risque cardiovasculaires mentionnés préalablement peuvent léser l'endothélium et altérer ainsi sa fonction « protectrice ». Un endothélium lésé favorise l'infiltration et l'accumulation des LDL, qui seront par la suite oxydés dans l'intima. Ces LDL oxydés vont jouer le rôle d'auto-antigènes et induire une réponse inflammatoire locale caractérisée par l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium, principalement VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) et ICAM-1, qui vont engendrer le recrutement des cellules immuno-inflammatoires, en particulier les monocytes et lymphocytes T (20). Après l'adhésion des monocytes à l'endothélium, ceux-ci vont pénétrer dans l'espace sous-endothélial et se différencier en macrophage sous l'influence du MCSF (monocyte colony stimulating factor) sécrété par les CML et les cellules endothéliales. Ces macrophages vont alors naturellement phagocyter les LDL oxydés, puis se transformer en cellules spumeuses (Foam cells) suite à leur saturation en lipides. Les foam cells constituent le premier stade de la plaque athéromateuse en donnant naissance au cœur lipidique de la plaque. De récentes études ont démontré l'existence de deux types de macrophages au sein de la plaque, les macrophages pro-inflammatoires M1 et les macrophages anti-inflammatoires

M2 (20). Les macrophages M1 sont dits pro-athérogènes et seraient prédominants dans la maladie athéromateuse. Ils seraient aussi responsables de l'inflammation chronique qui caractérise l'ATS. En effet, ceux-ci libèrent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1, ou encore les radicaux libres et par là amplifient/stimulent l'infiltration des LDL dans la paroi artérielle, l'adhésion cellulaire, le recrutement des monocytes, ou encore la prolifération des CML. Au contraire, les macrophages M2 auraient plutôt un effet anti-athérogène via la production de divers facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 et/ou le TGF- β (transforming growth factor- β) (20).

Parallèlement aux monocytes, les lymphocytes T, majoritairement les lymphocytes T CD4⁺, s'infiltrant dans l'intima, et vont eux aussi se différencier, essentiellement en CD4⁺ T helper 1 (Th1) ou CD4⁺ T helper 2 (Th2). Néanmoins, dans les lésions athéromateuses, les Th1 prédominent et produisent des chémokines et cytokines pro-inflammatoires, principalement l'IFN- γ , qui jouent un rôle majeur dans le développement de la plaque athéromateuse et sa vulnérabilité. Les Th2 quant à eux auraient plutôt une action anti-athérogène, via la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-5, IL-10 et/ou IL-13) (20,21).

Finalement, la réaction inflammatoire va également stimuler les CML, qui, en réponse aux facteurs de croissance produits par les cellules immunitaires, vont migrer de la média à l'intima, se proliférer et enfin sécréter du collagène, des fibres élastiques, ou encore des molécules pro-inflammatoires telles que le VEGF (vascular endothelial growth factor), l'IL-1 ou encore le TNF- α (20,21). Les CML vont finalement constituer la chape fibreuse de la plaque qui va recouvrir le cœur lipidique.

2.3. Plaque stable, plaque vulnérable et angiotensine II

Les plaques d'ATS vont progresser et évoluer vers deux types de phénotype (plaque stable versus plaque vulnérable) aux conséquences cliniques distinctes comme nous l'avons décrit précédemment. Ces plaques diffèrent par leurs caractéristiques morphologiques et leurs compositions cellulaires.

La plaque avec un **phénotype stable (Figure 3)** est composée d'un cœur lipidique de petite taille et d'une chape fibreuse épaisse composée d'un nombre important de CML. La plaque stable se caractérise aussi par un contenu en cellules immuno-inflammatoires (macrophages et lymphocytes T) faible.

Les plaques avec un **phénotype vulnérable (Figure 4)** sont composées, à l'inverse, d'un cœur lipidique de grande taille (généralement d'une taille supérieure à 50% de la taille totale de la plaque), et d'une chape fibreuse fine contenant par conséquent peu de CML. La plaque vulnérable contient un nombre important de cellules immuno-inflammatoires. D'autres caractéristiques sont également associées au phénotype vulnérable telles qu'une inflammation importante de l'adventice (tunique externe du vaisseau), une dégénérescence de la media (atrophie) et/ou une fragmentation de la limitant élastique interne, ou encore une néovascularisation avec la formation de vasa vasorum (1,22,23).

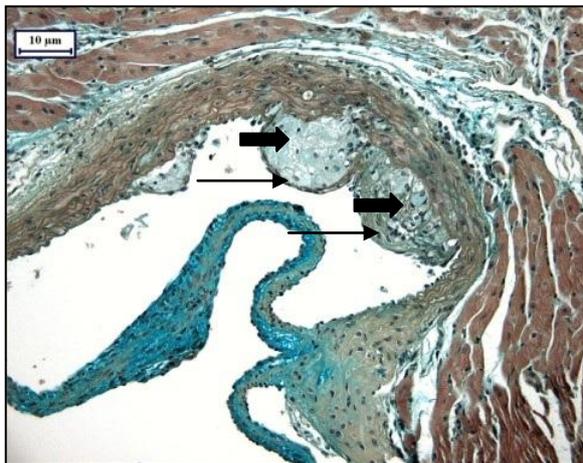


Figure 3. Coupe transversale réalisée au niveau du sinus aortique chez une souris ApoE^{-/-}, modèle expérimental d'ATS. Les flèches (épaisses) indiquent la présence de deux plaques d'ATS de petite taille avec un phénotype **stable**. Ces plaques se caractérisent par l'absence d'un cœur lipidique et par la présence d'une chape fibreuse (flèches fines) qui recouvre la plaque et qui lui assure donc stabilité (24).

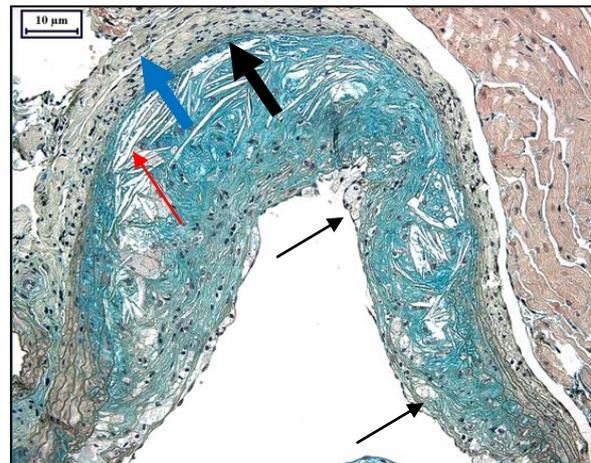


Figure 4 Coupe transversale réalisée au niveau du sinus aortique chez une souris ApoE^{-/-} 2K1C. La plaque d'ATS de grande taille présente un phénotype **vulnérable** avec un cœur lipidique volumineux composé de cristaux de cholestérol (flèche rouge) et une chape fibreuse mince et discontinue (flèches fines) Cette plaque présente aussi une atrophie de la média (flèche épaisse) et une inflammation de l'adventice (flèche épaisse bleue) (24)

Les mécanismes exacts responsables de la transformation d'une plaque stable en une plaque vulnérable sont encore inconnus. Néanmoins, le service d'angiologie a montré que l'ang II joue un rôle majeur dans la « déstabilisation » de la plaque (1). Pour mettre en évidence expérimentalement le rôle de l'ang II dans l'ATS, l'équipe du Prof. Mazzolai a généré pour la 1^{ère} fois le modèle 2K1C (modèle d'hypertension rénovasculaire ang II-dépendante) chez un modèle murin d'ATS, la souris C57BL/6 ApoE^{-/-}.

L'apolipoprotéine E (ApoE) est un constituant des lipoprotéines plasmatiques produite par les hépatocytes, les macrophages des tissus périphériques et localement par les cellules gliales du cerveau (25). Elle a une fonction de ligand pour le récepteur des LDL, pour le récepteur LRP (LDL-receptor related protein) ainsi que pour le récepteur des VLDL (very-low density Lipoprotein) nécessaires à la captation et à l'élimination des LDL et VLDL circulants. L'ApoE produite par les macrophages dans la paroi des vaisseaux lésés permet une meilleure évacuation des lipides locaux, réduisant ainsi la formation de plaques d'ATS. Elle induit aussi la formation de monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur, et a de nombreux effets anti-inflammatoires (25). Ainsi, les souris dont le gène codant l'ApoE a été inactivé, sont incapables d'éliminer correctement les lipides et sont donc caractérisées par une hypercholestérolémie ainsi que par le développement spontané de lésions athérosclérotiques similaires à celles trouvées chez l'homme (26).

Le modèle 2K1C est généré en induisant chirurgicalement une sténose rénale unilatérale par la pose d'un clip au niveau de l'artère rénale gauche. La sténose rénale provoque une diminution de la pression de perfusion du rein. Pour compenser cette hypoperfusion rénale, l'appareil juxtaglomérulaire du rein va synthétiser et sécréter continuellement de la rénine et donc de l'ang II qui est, entre autres, un puissant vasoconstricteur (**Figure 5**). Ces souris ApoE^{-/-} 2K1C se caractérisent par conséquent par des taux d'ang II circulant élevés avec une hypertension dépendante de l'ang II. Comme groupe contrôle, des souris également hypertendues mais avec des taux circulants d'ang II normaux ont été utilisées (modèle apoE^{-/-} 1 rein-1 clip (1K1C)). Les procédures chirurgicales et la caractérisation des modèles ApoE^{-/-} 2K1C et 1K1C sont détaillées dans la publication de Wiesel et al (27).

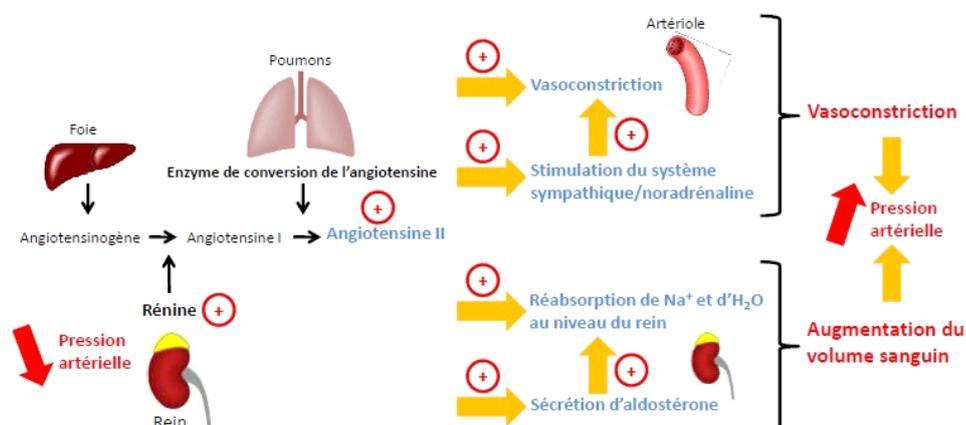


Figure 5. Production et effets biologiques de l'ang II

Quatre semaines après la pose du clip, les résultats ont montré que les animaux avec un taux d'ang II circulant continuellement élevé (souris ApoE^{-/-} 2K1C) ont développé des plaques avec un phénotype vulnérable contrairement aux souris avec un taux d'Ang II normal (souris ApoE^{-/-} 1K1C) qui ont développé des plaques avec un phénotype stable. Ce travail montre clairement que l'ang II joue un rôle prépondérant dans la vulnérabilité de la plaque athéromateuse et ce, indépendamment de la pression artérielle.

2.4. Neutrophiles et athérosclérose : état de la littérature

Comme nous l'avons explicité ci-dessus, le rôle des macrophages et des lymphocytes T CD4⁺ dans l'initiation et la progression des plaques d'ATS est à présent bien connu. Mais qu'en est-il du rôle des neutrophiles dans l'ATS ?

De récentes études suggèrent que les neutrophiles pourraient jouer un rôle important dans l'initiation, la progression et la vulnérabilité de la plaque.

Cette hypothèse découle en premier lieu de plusieurs études qui ont montré la présence de neutrophiles dans les plaques d'ATS chez l'homme (5,28) et le modèle animal (4,7,29). Par exemple, Naruko et al. (28) ont montré un nombre important de neutrophiles dans les plaques coronariennes obtenues à l'autopsie de patients avec un infarctus du myocarde ou par athérectomie chez des patients présentant une angine de poitrine instable. Plus récemment, Ionita et al. (5) ont observé, au niveau de plaques carotidiennes, une association forte entre le nombre de neutrophiles et le caractère vulnérable de la plaque, suggérant pour la 1^{ère} fois un rôle des neutrophiles dans la « déstabilisation » de la plaque. De même, Drechsler et al. (4) ainsi que Van Leeuwen et al. (30) ont mis en évidence la présence de neutrophiles dans les plaques d'ATS chez la souris ApoE^{-/-} et LDLR^{-/-} (low density lipoprotein receptor ; un autre modèle expérimental d'ATS) et ce, à chaque stade d'évolution de la plaque (stade initial, intermédiaire et avancée). En utilisant le modèle animal, Drechsler et al. (4) ont cherché à comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des effets potentiellement pro-athérogène des neutrophiles. Ainsi, leur étude a montré, chez des souris ApoE^{-/-}, que les neutrophiles infiltraient les artères (précisément les aortes), grâce aux récepteurs CCR1 (chemokine receptor type 1), CCR2 (chemokine receptor type 2) et CCR 5 (chemokine receptor type 5) entre autres.

3. OBJECTIFS DU MEMOIRE

Au regard de la revue de littérature, plusieurs études ont suggéré une participation des neutrophiles dans l'athérogénèse et dans la déstabilisation des plaques. Cependant, ces études restent encore trop peu nombreuses pour définitivement affirmer un rôle pro-athérogène des neutrophiles. D'autre part, les mécanismes moléculaires (voies de signalisation, régulation d'expression de gène..) activés/stimulés par les neutrophiles sont encore largement inconnus. Le laboratoire d'angiologie a montré, via le modèle murin ApoE^{-/-} 2K1C, le rôle clé de l'ang II dans le développement des plaques d'ATS vulnérables avec vraisemblablement une action directe sur les macrophages et lymphocytes T CD4⁺. A présent, nous souhaitons déterminer si les neutrophiles sont aussi des acteurs dans le développement de la plaque d'ATS vulnérable ang II-dépendante.

Pour répondre à cet objectif, il est nécessaire, dans un premier temps, de s'assurer de la possibilité de pouvoir dépléter les neutrophiles pendant toute la période expérimentale nécessaire au développement des plaques instables chez notre modèle ApoE^{-/-} 2K1C, soit quatre semaines.

Le but de ce travail a donc été premièrement de produire l'anticorps anti-neutrophiles NIMP-R14, et deuxièmement de tester son effet déplétant *in vivo* chez la souris ApoE^{-/-} 2K1C.

4. MATERIELS ET METHODES

4.1. Animaux

Pour ce travail, des souris mâles ApoE^{-/-} de fond génétique C57BL/6J âgées de 12 à 20 semaines ont été utilisées. Ces souris ont été fournies par l'animalerie du site d'Epalinges de l'Université de Lausanne.

Pendant toute la durée de l'expérience, les animaux ont eu un accès *ad libitum* à la nourriture (régime standard pour rongeurs, Kliba-Nafag, Suisse) et à l'eau.

Toutes les expériences décrites ci-dessous ont été approuvées par le Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud (numéro d'autorisation 1321.4) selon les recommandations de l'office vétérinaire fédéral.

4.2. Production de l'anticorps NIMP- R14

4.2.1. Hybridome

L'anticorps NIMP-R14 nécessaire à la déplétion des neutrophiles a été produit dans notre laboratoire à partir d'un hybridome gracieusement donné par la Professeure Fabienne Tacchini-Cottier et le Dr Mélanie Charmoy (WHO-IRTC, Département de Biochimie, Université de Lausanne, Epalinges).

Brièvement, un hybridome est une cellule qui provient de l'hybridation entre des cellules B et des cellules myélomateuses (cellules cancéreuses immortelles). De ce fait, l'hybridome cumule les propriétés des deux cellules de départ, à savoir production spécifique d'anticorps pour le lymphocyte et immortalité pour la cellule cancéreuse. Ainsi, les hybridomes donnent des lignées immortalisées stables productrices d'anticorps monoclonaux. Ici, l'hybridome utilise la lignée de myélome de souris 210RCY3-Ag123. L'anticorps produit, le NIMP-R14, est un anticorps monoclonal de type IgG2b de rat qui reconnaît spécifiquement les protéines Ly-6C/6G (Lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C) murines. Ly6G et Ly6C sont des composants de l'antigène de différenciation myéloïde Gr-1. L'expression de Gr-1 dans la moelle osseuse est corrélée avec la différenciation et la maturation des granulocytes. Il est démontré que cet anticorps NIMP-R14 permet d'induire une neutropénie *in vivo*, probablement via l'inhibition de la différenciation et de la maturation du neutrophile.

4.2.2. Protocole

Le protocole détaillé pour la production de l'anticorps monoclonal NIMP-R14 à partir de l'hybridome est annexé au chapitre 8 (Annexes).

Brièvement, les cellules ont été décongelées, puis mises en culture dans du milieu RPMI-1640 enrichi avec 20% de FCS (fetal calf serum) et contenant un antibiotique (pénicilline streptomycine) dans une atmosphère de culture à 37°C et 5% CO₂, à raison de 500 000 cellules par boîte T75 cm² dans 10 ml de milieu. Le passage des cellules se fait environ 2 fois par semaine. Après chaque passage, 15 ml de surnageant (contenant les anticorps) sont récupérés et concentrés sur des colonnes (Amicon Ultracell 100K ; UFC 910024 Millipore, Suisse) afin de réduire le volume à 300 µl. Il s'en suit une étape de purification qui consiste à faire passer le concentré sur une colonne de chromatographie (ref 1536159 ; kit Biorad, Prot A affigel MAPSII Kit, Suisse). Finalement, le dosage de l'anticorps dans notre échantillon est réalisé par une méthode immuno-enzymatique ELISA (ref E101-111; Bethyl, Suisse). Après le dosage, l'échantillon est conditionné de manière stérile selon les protocoles expérimentaux définis.

4.3. Evaluation de l'efficacité de l'anticorps NIMP-R14

4.3.1 Injection de l'anticorps chez la souris

L'anticorps NIMP-R14 a été administré chez nos animaux par la voie intra-péritonéale. Pour chaque injection, une dose de 250 µg d'anticorps diluée dans 500 µl de tampon phosphate salin (PBS) a été utilisée. Nous avons choisi d'utiliser 250 µg d'anticorps par injection car c'est la dose majoritairement utilisée dans les précédentes études (8). Les animaux ont reçu une ou plusieurs injections d'anticorps au cours des différentes expériences comme nous le détaillerons ci-après. Les injections se font après anesthésie générale de l'animal par isoflurane mélangée avec de l'O₂.

4.3.2. Prise de sang :

Les prélèvements sanguins chez nos animaux ont été réalisés par ponction au niveau du sinus veineux rétro-orbitaire, après anesthésie générale à l'isoflurane. Brièvement, environ 200 µl de sang sont prélevés au moyen de pipettes capillaires (minicaps 10 µl, Hirschmann Laborgerate, Allemagne) et récoltés dans des tubes capillaires de prélèvement (Microvette CB300 Di-Kalium-EDTA, Sarstedt, Allemagne) sur glace.

4.3.3. Marquage direct des neutrophiles

Le protocole du marquage des neutrophiles dans le sang périphérique est détaillé dans le chapitre 8 (Annexes).

Ces expériences ont été réalisées dans le service d'hématologie sous la direction du Professeur Michel Duchosal et avec les conseils avisés du Dr Aimable Nahimana.

Brièvement, les globules rouges sont lysés avec une solution NH₄CL (fournie par le service d'hématologie pendant 10 min sur glace avec agitation. Après centrifugation, le culot cellulaire contenant les globules blancs est resuspendu dans 500 µl de PBS-BSA (Bovine serum Albumin) 0.1% (fournie par le service d'hématologie). Après ce lavage, l'anticorps de rat anti-souris CD16/CD32 (clone 2.4G2; Isotype : IgG2b; BD Pharmingen, Suisse ; 1 µl pour 100 µl de suspension cellulaire), est ajouté. Le rôle de cet anticorps non marqué est de saturer les sites membranaires de fixation non spécifique (récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines). Parallèlement, les neutrophiles sont marqués par l'ajout de l'anticorps de rat anti-souris Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) couplé au fluorochrome FITC (clone RB6-8C5; Isotype : IgG2b; BioLegend, Suisse ; 1 µl pour 100 µl de suspension cellulaire). Un anticorps isotypique contrôle correspondant (IgG2B de rat; BioLegend, Suisse; 1 µl pour 100 µl de suspension cellulaire) également conjugué à la FITC est utilisé pour déterminer la part non-spécifique du marquage (bruit de fond) de l'anticorps anti-Ly6G. Les anticorps sont incubés 30 minutes sur glace, à l'abri de la lumière.

4.3.4. Analyse par cytométrie de flux

Le pourcentage de neutrophiles parmi les leucocytes circulants est mesuré dans chacun de nos prélèvements sanguins par cytométrie de flux sur l'appareil Cytomics FC500 (Beckman Coulter). Les données obtenues sont analysées avec le logiciel Kaluza (version 1.1, Beckman Coulter). 50 000 événements sont analysés pour chaque échantillon.

Lors de l'analyse au cytomètre, les événements (cellules) sont tout d'abord triés en fonction de leur granularité (SS : side scatter) et de leur taille (FS : forward scatter) afin de distinguer les différentes populations de leucocytes (lymphocytes, granulocytes et monocytes) (**Figure 6**). Ensuite, le pourcentage de neutrophiles (exprimant le Ly-6G) est déterminé dans notre population d'intérêt (granulocytes) puis le % de neutrophiles parmi les leucocytes circulants est finalement calculé.

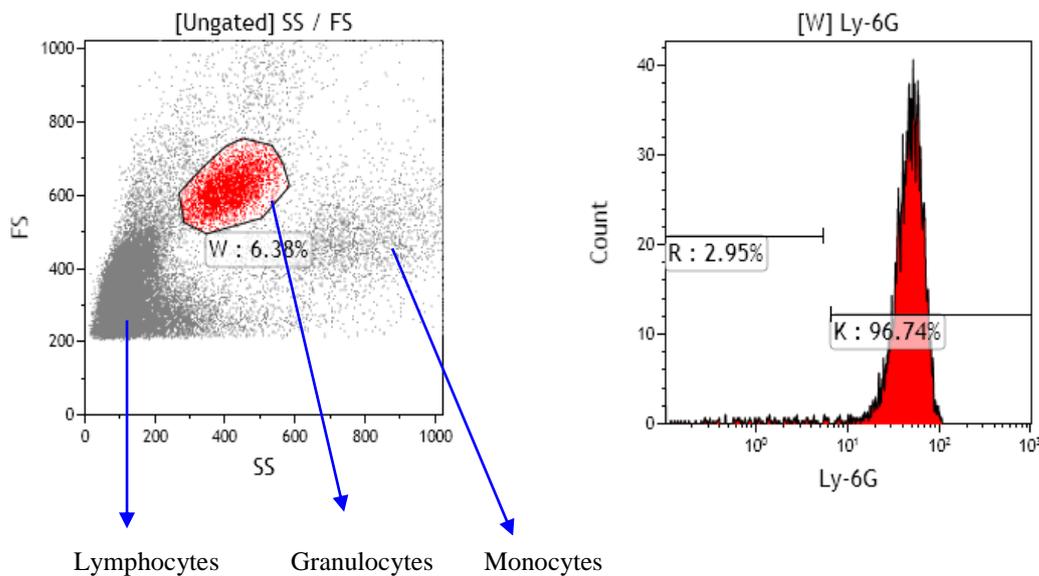


Figure 6.

Gauche: fenêtre SS-FS permettant de séparer les différentes populations de leucocytes chez la souris.

Droite: histogramme montrant le % de cellules marquées positivement par l'anticorps anti Ly-6G (population K) dans notre population d'intérêt (population W) qui correspond aux granulocytes. Dans notre population d'intérêt, 96.7% des cellules sont donc des neutrophiles. Nous pouvons donc en déduire que notre échantillon contient 6.17% de neutrophiles parmi les leucocytes circulants.

4.4. Analyse statistique :

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les comparaisons ont été effectuées avec un test t pour échantillons appariés ou non appariés. La valeur $p < 0.05$ est considérée comme significative. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad version 6.0 (USA).

5. ETUDE DE LA DEPLETION ET DE LA RECONSTITUTION DES NEUTROPHILES

Une fois les anticorps NIMP-R14 produits, nous avons testé leur efficacité *in vivo* chez notre modèle animal. Nous avons donc effectué trois expériences afin d'étudier la cinétique de la déplétion et la reconstitution des neutrophiles.

5.1. Expérience n°1

L'objectif de cette première expérience a été de vérifier si l'anticorps NIMP-R14 produit dans notre laboratoire permettait de dépléter les neutrophiles, et si oui, à quelle pourcentage, et pour combien de temps.

Trois souris mâles ApoE^{-/-} ont été utilisées pour cette première expérience. Ces souris ont reçu une injection de NIMP-R14 (250 µg) (cf paragraphe 4.3.1.).

Avant l'injection, puis respectivement à 24h, 48h, 5 jours et 8 jours après l'injection, des échantillons de sang ont été prélevés chez ces 3 animaux pour déterminer le taux de neutrophiles par analyse en cytométrie de flux selon le protocole détaillé dans le paragraphe 4.3.4.

Les résultats montrent que le taux basal moyen de neutrophiles (avant injection) parmi les leucocytes circulants est de 5.29% ± 1.05. Vingt-quatre heures après l'injection, nous observons une déplétion quasiment totale des neutrophiles (0.004% ± 0.003, p<0.05 versus avant injection ; **Figures 7 et 8**). Cette déplétion totale des neutrophiles se prolonge 48h (0.01% ± 0.01, p<0.05 versus avant injection ; **Figure 9**) et 5 jours (0.03% ± 0.03, p<0.05 versus avant injection ; **Figure 10**) post-injection. Néanmoins, 8 jours post-injection (**Figure 11**), le taux de neutrophiles est significativement augmenté comparativement à ceux obtenus à 24h, 48h et 5 jours post-injection (12.15% ± 0.54, p<0.01), et est même significativement plus élevé que le taux basal (p<0.01) (**Graphique 1**).

Pour vérifier ce résultat, une 2^{ème} injection a été effectuée chez ces mêmes animaux.

Vingt-quatre heures après cette 2^{ème} injection (**Figure 12**), la neutropénie est de nouveau quasiment totale (0.07% ± 0.04, p<0.05 versus avant 2^{ème} injection et p<0.01 versus 8 jours post-1^{ère} injection). Après 6 jours, le taux de neutrophiles retrouve sa valeur basale (5.12% ± 1.52, p<0.05 versus 24h post-2^{ème} injection) (**Figure 13**).

En conclusion, nos résultats indiquent que l'injection de 250 µg d'anticorps induit une neutropénie profonde chez la souris ApoE^{-/-} pendant environ 5 jours.

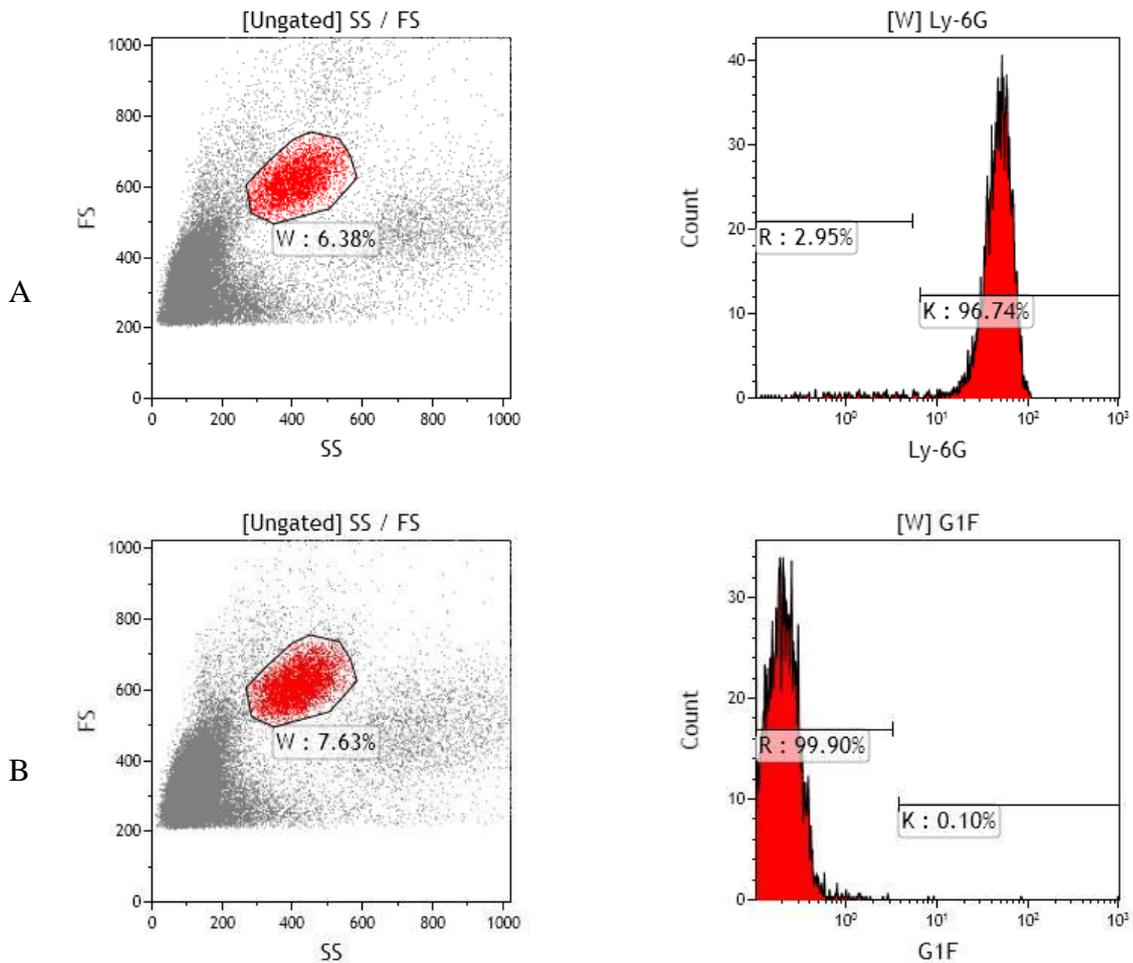


Figure 7. Détermination du pourcentage de neutrophiles circulants dans les leucocytes avant injection de l'anticorps NIMP-R14 (taux basal) chez la souris ApoE^{-/-}.
 A : marquage avec l'anticorps anti-Ly-6G couplé au FITC. A gauche, le diagramme FS-SS montre les 3 populations de leucocytes précédemment décrites dans la Figure.6. A droite, la fenêtre montre population de cellules exprimant le Ly-6G correspondant aux neutrophiles.
 B : marquage fait avec l'anticorps isotypique contrôle (G1F). L'histogramme de droite montre qu'aucune cellule n'est marquée positivement par cet anticorps dans la population d'intérêt W.

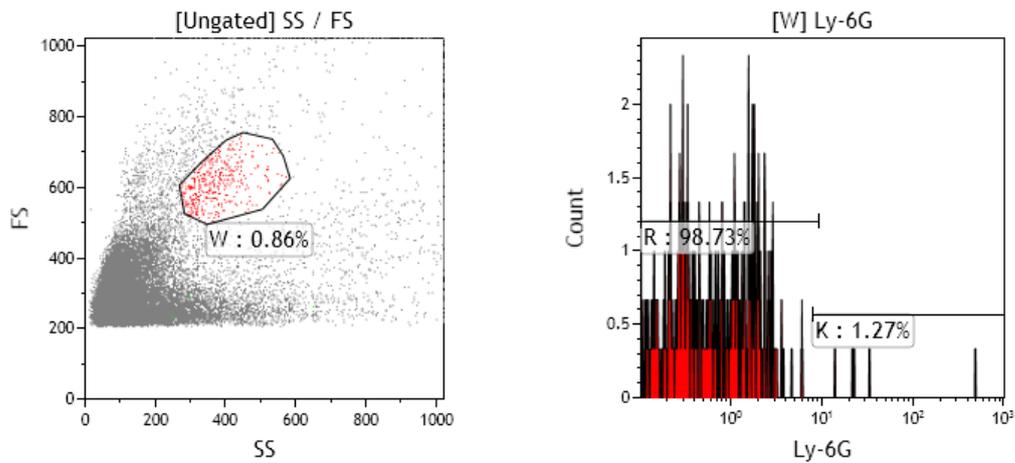


Figure 8. Détermination du pourcentage de neutrophiles circulants dans les leucocytes 24 heures après injection de l'anticorps NIMP-R14 chez la souris ApoE^{-/-}. La fenêtre à gauche montre clairement une diminution du nombre de granulocytes circulants (population W). Dans ces 0.86% de granulocytes, aucune cellule n'est marquée positivement par l'anticorps Ly-6G ce qui indique que le taux de neutrophiles circulants est nul.

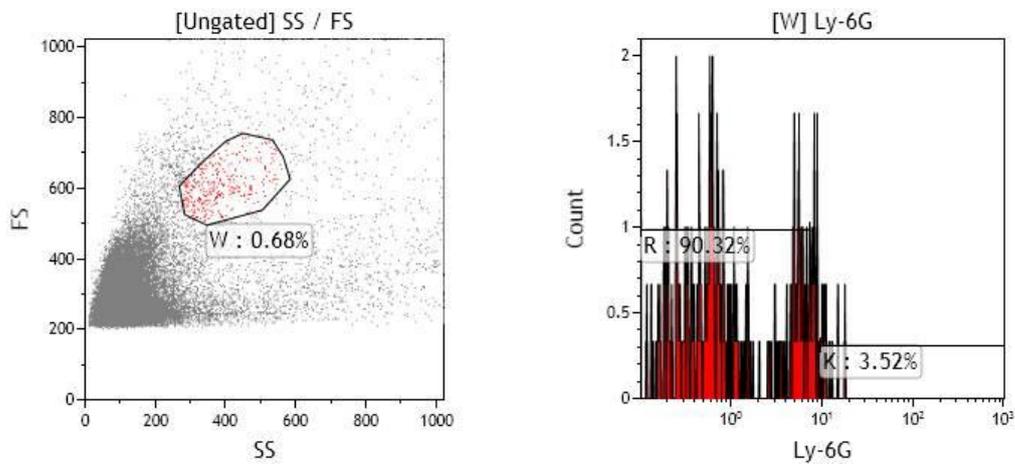


Figure 9. Détermination du pourcentage de neutrophiles circulants dans les leucocytes 48 heures après injection de l'anticorps NIMP-R14 chez la souris ApoE^{-/-}. De manière similaire à la figure 8, la fenêtre à gauche montre clairement un nombre de granulocytes circulants faible (population W). Dans ces 0.68% de granulocytes, aucune cellule n'est marquée positivement par l'anticorps Ly-6G ce qui indique que le taux de neutrophiles circulants est nul.

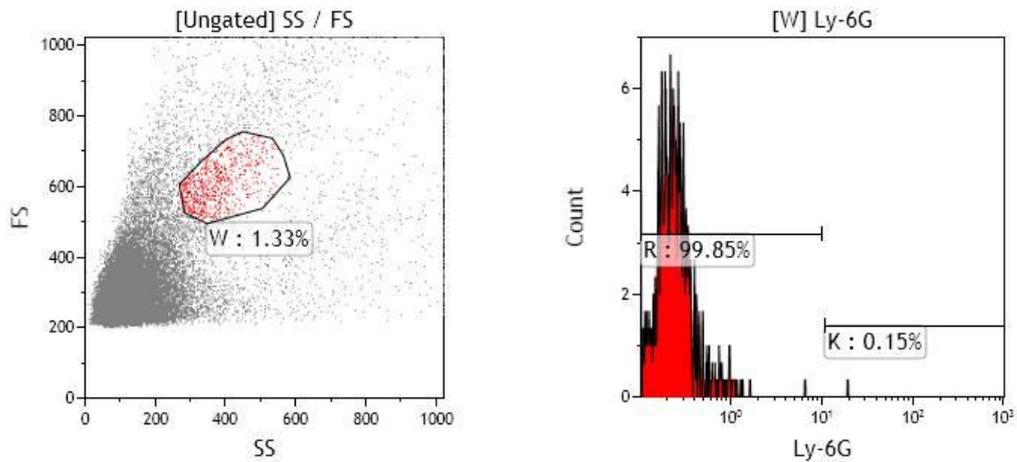


Figure 10. Détermination du pourcentage de neutrophiles circulants dans les leucocytes 5 jours après injection de l'anticorps NIMP-R14 chez la souris ApoE^{-/-}.

De manière similaire à la figure 8 et 9, la fenêtre à gauche montre clairement un nombre de granulocytes circulants faible (population W). Dans ces 1.33% de granulocytes, aucune cellule n'est marquée positivement par l'anticorps Ly-6G ce qui indique que le taux de neutrophiles circulants est nul.

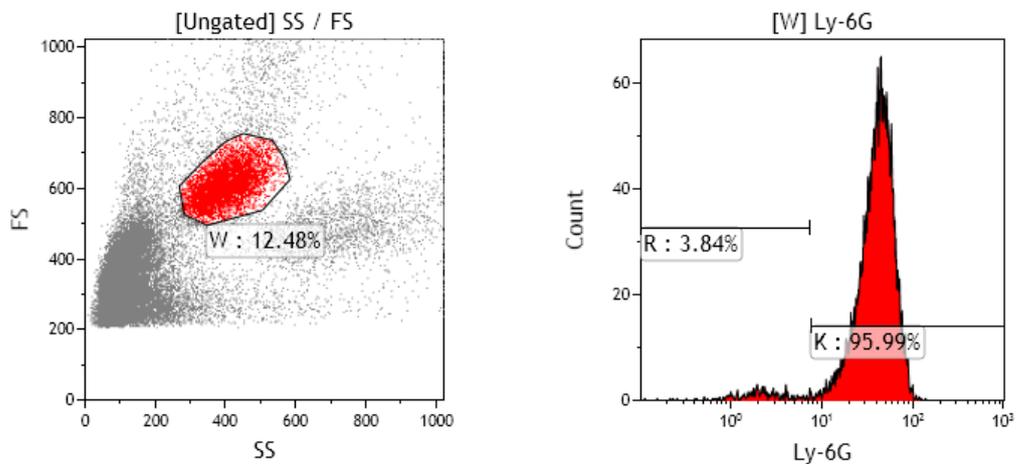


Figure 11. Détermination du pourcentage de neutrophiles circulants dans les leucocytes 8 jours après injection de l'anticorps NIMPP-R14 chez la souris ApoE^{-/-}.

La fenêtre à gauche montre clairement une augmentation du nombre de granulocytes circulants par rapport aux figures précédentes (population W). Dans ces 12.48% de granulocytes, 95.99 % sont marqués positivement par l'anticorps Ly-6G ce qui indique que le taux de neutrophiles circulants est de 11.98 %.

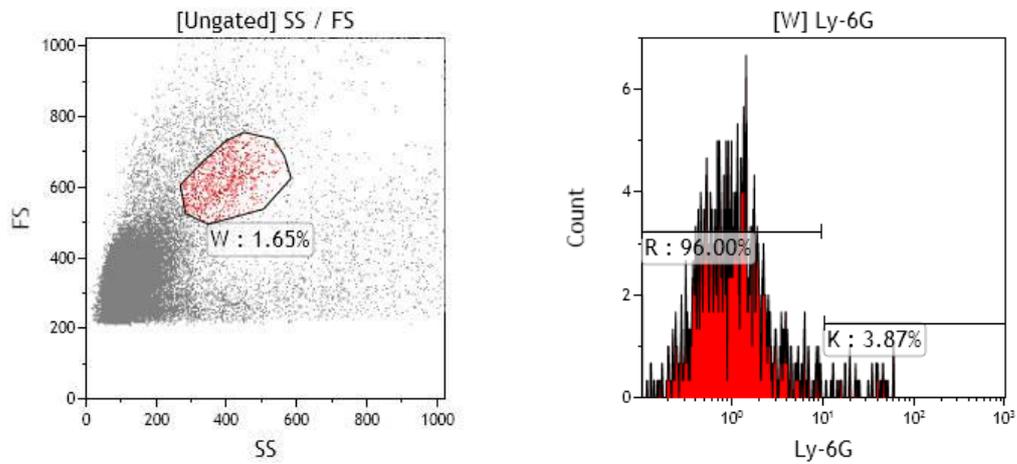


Figure 12. Détermination du pourcentage de neutrophiles circulants dans les leucocytes 24 heures après la 2^{ème} injection de l'anticorps NIMP-R14 chez la souris ApoE^{-/-}.

La fenêtre à gauche montre aussi une diminution du nombre de granulocytes circulants (population W). Dans ces 1.65 % de granulocytes, seuls 3.87 % sont marqués positivement par l'anticorps Ly-6G ce qui indique que le taux de neutrophiles circulants est de 0.064%.

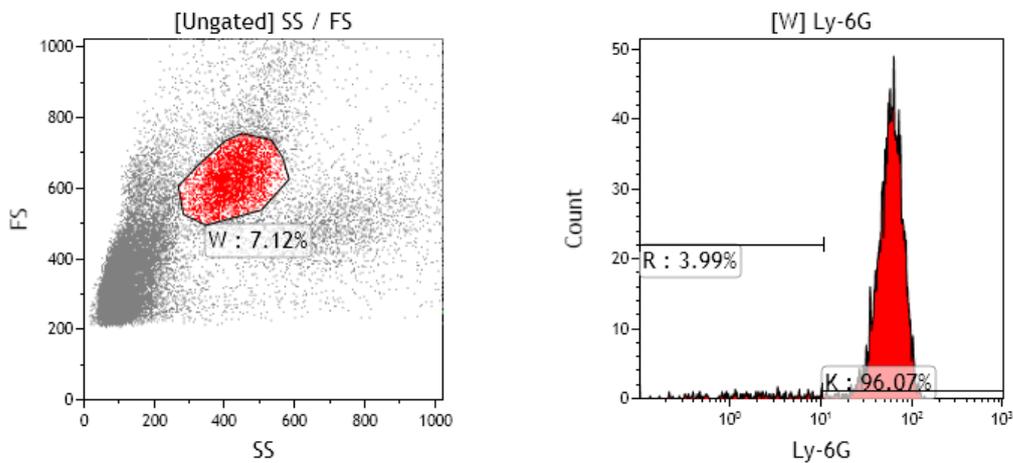
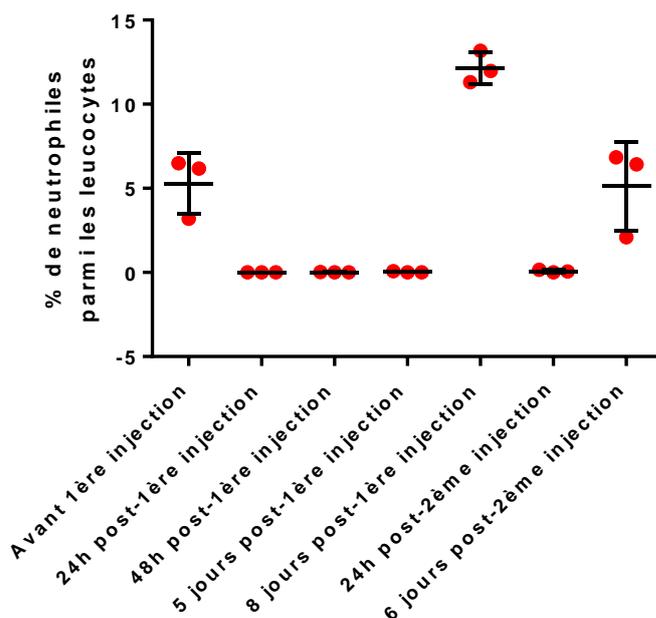


Figure 13. Détermination du pourcentage de neutrophiles circulants dans les leucocytes 6 jours après la 2^{ème} injection de l'anticorps NIMP-R14 chez la souris ApoE^{-/-}.

La fenêtre à gauche montre clairement une augmentation du nombre de granulocytes circulants par rapport à la figure précédente (population W). Dans ces 7.12% de granulocytes, 96.07 % sont marqués positivement avec l'anticorps Ly-6G ce qui indique que le taux de neutrophiles circulants est de 6.84%.



Graphique 1. Cinétique de la reconstitution des neutrophiles après administration de l'anticorps NIMP-R14 chez la souris ApoE^{-/-}. Pour chaque mesure, les données individuelles des souris sont représentées par les cercles rouges.

5.2. Expérience n°2

L'objectif de cette 2^{ème} expérience a été de confirmer l'effet déplétant de notre anticorps NIMP-R14 chez notre modèle murin de plaque d'ATS instables ang II-dépendantes (la souris ApoE^{-/-} 2K1C) sur une durée de 4 semaines.

Pour cette 2^{ème} expérience, deux groupes de souris ont été utilisés et comparés. Le 1^{er} groupe de souris ApoE^{-/-} 2K1C (n=3) a reçu des injections de NIMP-R14 (250 µg) tous les 3-4 jours (groupe expérimental) alors que le 2^{ème} groupe (n=2) a reçu des injections de PBS (groupe contrôle) à la même fréquence. La 1^{ère} injection (NIMP-R14 ou PBS) a été réalisée 2 jours avant la pose du clip rénale. Le choix de la fréquence d'injection (tous les 3-4 jours) repose sur les données issues de notre 1^{ère} expérience. En effet, étant donné que la première expérience nous a montré que l'anticorps NIMP-R14 provoquait une neutropénie profonde sur une durée de 5 jours environ, nous avons décidé de rapprocher les injections afin de nous laisser une marge de « sécurité ».

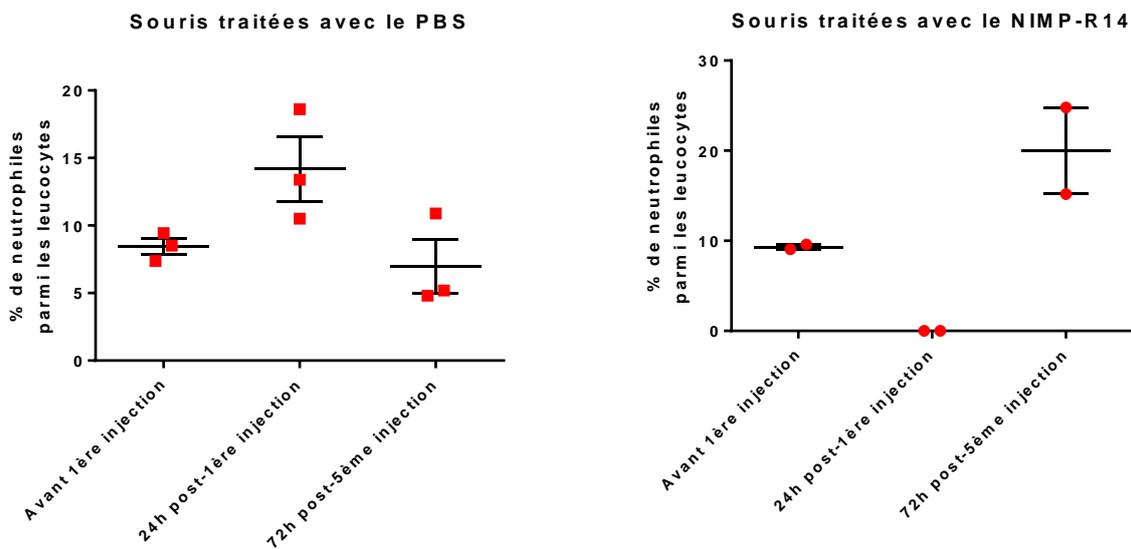
Avant l'injection, puis respectivement à 24h après la 1^{ère} injection puis à 72h après la 5^{ème} injection (soit 17 jours après le début du traitement), des échantillons de sang ont été prélevés et analysés par cytométrie de flux.

Les résultats montrent que le taux basal de neutrophiles est identique entre les 2 groupes de souris ApoE^{-/-} 2K1C (9.32% ± 0.27 pour le groupe expérimental traité avec le NIMP versus 8.44% ± 0.6% pour les souris contrôles traitées avec le PBS, p=non significatif) (**Graphique 2**).

Vingt-quatre heures après la première injection de NIMP-R14, l'anticorps a provoqué une déplétion totale des neutrophiles chez le groupe expérimental (p<0.01 versus avant injection), confirmant ainsi les résultats de la 1^{ère} expérience. Dans le groupe contrôle, le taux de neutrophiles est augmenté (de 14.7% ± 2.37) par rapport à avant la 1^{ère} injection de PBS bien que cette différence ne soit pas significative. Cette élévation du taux de neutrophiles pourrait refléter une petite réaction inflammatoire suite au " traumatisme" de l'injection (**Graphique 2**).

Soixante douze heures après la 5^{ème} injection (donc 24h avant la 6^{ème} injection), le taux de neutrophiles est augmenté (19.9% ± 4.8) chez le groupe contrôle comparativement à 24h post-injection (p<0.05). Les souris du groupe contrôle ont quand à elles un taux de neutrophile similaire à la valeur basale (6.97% ± 1.97) (**Graphique 2**).

En conclusion, l'injection de l'anticorps NIMP-R14 tous les 3-4 jours a permis de provoquer une neutropénie profonde chez la souris ApoE^{-/-} 2K1C sur une période de 17 jours.



Graphique 2. Cinétique de la reconstitution des neutrophiles après administration tous les 3-4 jours de l'anticorps NIMP-R14 (groupe expérimental) ou de PBS (groupe contrôle) chez la souris ApoE^{-/-}2K1C. Pour chaque mesure, les données individuelles des souris sont représentées par les cercles rouges.

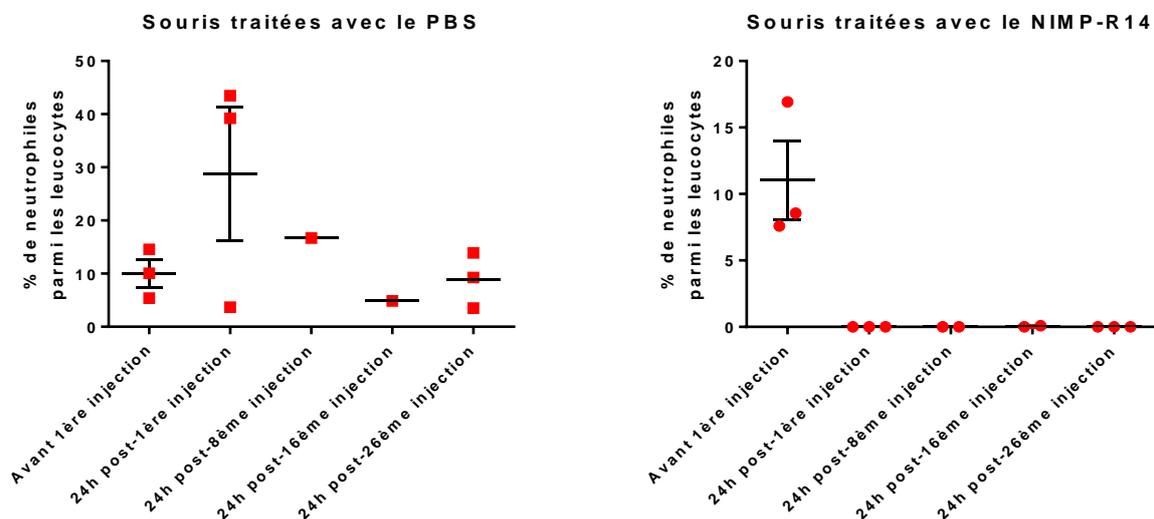
5.3. Expérience n°3

Au vu des résultats obtenus dans l'expérience 2, nous avons décidé de répéter l'expérience chez des souris ApoE^{-/-} 2K1C en injectant cette fois-ci l'anticorps non plus tous les 3-4 jours mais quotidiennement. Nous avons à nouveau utilisé 2 groupes de souris ApoE^{-/-} 2K1C qui ont reçu respectivement des injections de NIMP-R14 (groupe expérimental, n=3) et du PBS (groupe contrôle, n=3).

Les résultats montrent, de manière similaire aux expériences précédentes, un taux basal de neutrophiles identiques entre les 2 groupes de souris (11.03% ± 2.96 pour le groupe expérimental versus 10.01% ± 2.65 pour le groupe contrôle, p= non significatif).

Les analyses en cytométrie de flux effectuées 24h après les 1^{ère}, 8^{ème}, 16^{ème} et 26^{ème} injections révèlent des résultats concluants.

En effet, nous observons une déplétion totale et chronique des neutrophiles chez les souris ApoE^{-/-} 2K1C du groupe expérimental (p<0.01 versus taux avant injection) tandis que le taux de neutrophiles chez les souris ApoE^{-/-} 2K1C du groupe contrôle est resté relativement stable tout au long de l'étude (**Graphique 3**).



Graphique 3. Cinétique de la reconstitution des neutrophiles après administration quotidienne de l'anticorps NIMP-R14 (groupe expérimental) ou de PBS (groupe contrôle) chez la souris ApoE^{-/-} 2K1C. Pour chaque mesure, les données individuelles des souris sont représentées par les cercles rouges.

6. DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de ce travail a été de développer un protocole pour produire l'anticorps NIMP-R14 à partir d'un hybridome afin de dépléter chroniquement *in vivo* les neutrophiles chez le modèle murin ApoE^{-/-} 2K1C. Au final, nous avons démontré qu'il est possible d'induire une neutropénie totale chez ce modèle et ce, pendant quatre semaines (période nécessaire à la formation des plaques d'ATS vulnérables), grâce à une injection quotidienne d'anticorps NIMP-R14 (250 µg). En effet, nous avons observé qu'une injection unique d'anticorps peut être efficace pendant 5 jours avant que le taux de neutrophiles n'augmente à nouveau. De même, une injection régulière (tous les 3-4 jours) ne permet pas d'induire une neutropénie chronique sur quatre semaines. Les mécanismes à l'origine de cette reconstitution des neutrophiles dans le temps sont encore inconnus à ce jour. Une hypothèse serait l'apparition de xeno-anticorps neutralisants qui auraient pour effet de limiter l'efficacité de l'anticorps NIMP-R14 d'origine rat.

Actuellement, le laboratoire d'angiologie utilise ce protocole d'injection quotidienne pour étudier le rôle des neutrophiles spécifiquement dans l'ATS ang II-dépendante. L'analyse post-mortem de l'ATS (surface et phénotype des plaques) permettra alors de déterminer si oui ou non les neutrophiles interviennent dans la genèse de la plaque vulnérable. Si les résultats s'avèrent positifs, d'autres travaux seront nécessaires pour déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents comme par exemple les voies de signalisation du neutrophile activées par l'ang II. La détermination de l'expression de gènes cibles au niveau des aortes et/ou des rates des souris ou encore des expériences *in vitro* avec notamment la stimulation de neutrophiles isolés de souris ApoE^{-/-} avec de l'ang II pourraient apporter des éléments de réponse.

A long terme, ce travail pourrait ouvrir de nouvelles perspectives cliniques pour la prise en charge de l'athérosclérose et la prévention de la plaque vulnérable.

7. REFERENCES

- 1) Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M, Bouzourene K, Aubert JF, Hao H, Vallet V, Brunner HR, Nussberger J, Giabbiani G, Hayoz D. Endogenous ang II induces Atherosclerotic Plaque Vulnerability and Elicits a Th1 Response in ApoE^{-/-} Mice. Hypertension. 2004;44:277-282
- 2) Pellegrin M, Aubert JF, Bouzourene K, Aubry D, Nussberger J, Duchosal MA, Mazzolai L. Critical role of Angiotensin II type 1 receptor on bone marrow-derived cell in the development of vulnerable atherosclerotic plaques in 2-Kidney, 1-Clip ApoE^{-/-} mice. Faculty of Biology and Medicine Research Day. Lausanne-Suisse. 2011
- 3) Pellegrin M, Nahimana A, Bouzourene K, Aubert JF, Aubry D, Nussberger J, Duchosal MA, Mazzolai L. Essential role of CD4 T cells in Angiotensin II-induced atherosclerosis and vulnerable atherosclerotic plaque development. European Society of Cardiology Congress. Paris-France. 2011
- 4) Drechsler M, Megens R, Van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. Circulation. 2010;122:1837-1845
- 5) Ionita MG, Van den Borne P, Catanzariti LM, Moll FL, de Vries JP, Pasterkamp G, Vink A, de Kleijn D. High Neutrophil Numbers in human Carotid atherosclerotic plaques are associated with Characteristics of Rupture-prone lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30:1842-1848
- 6) Drechsler M, Döring Y, Megens RT, Soehnlein O. Neutrophilic granulocytes-promiscuous accelerator of atherosclerosis. Thromb Haemost. 2011;106:839-848
- 7) Rotzius P, Thams S, Soehnlein O, Kenne E, Tseng CN, Björkström NK, Malmberg KJ, Lindbom L, Eriksson E.E. Distinct infiltration of neutrophils in lesions shoulders in ApoE^{-/-} Mice. The American Journal of Pathology. 2010;177:493-500
- 8) Faivre-Charmoy M. Thèse de doctorat ès Science de la Vie. Role of neutrophils in Leishmania infection. 2010 Lausanne
- 9) Xiao H, Heeringa P, Lui Z, Huugen D, Hu P, Maeda N, Falks RJ, Jennette JC. The Role of Neutrophils in the Induction of Glomerulonephritis by Anti-Myeloperoxidase Antibodies. Am J Pathol. 2005;167:39-45
- 10) Stevens A, Lowe. J Histology humaine 2ème édition. 1997:101-104
- 11) Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Matzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil functions: from mechanisms to disease. Annual Review of Immunology. 2012;30:459-89
- 12) Godaly G, Bergsten G, Hang L, Fischer H, Frendeus B, Lundstedt AC, Samuelsson M, Samuelsson P, Svanborg C. Neutrophil recruitment, chemokine receptor and resistance to mucosal infection. J Leukoc Biol. 2001;69:899-906
- 13) Lee WL, Harrison HE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophil. Microbes and Infection. 2003:1299-1306
- 14) Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leucocyte. Blood. 1997;89:3503-3521
- 15) Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. Lab Invest. 2000;80:617-53
- 16) OMS 2011 <http://www.un.org/apps/newsFr/storyF.asp?NewsID=26490&Cr=OMS&Cr1>

- 17) Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's principles of internal medicine 17th edition. The pathogenesis, prevention and treatment of atherosclerosis. 1501-1509
- 18) Herold G. *Innere Medizin*. 2010;766-767
- 19) http://www.pifo.uvsq.fr/hebergement/cec_mv/128b.pdf
- 20) Bui QT, Prempeh M, Wilensky RL. Atherosclerotic plaque development. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:2109-2113
- 21) Insull W Jr. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *Am J Med*. 2009;122:S3-S14
- 22) Ylä-Herttuala S, Fog Bentzon J, Daemen M, Falk E, Garcia-Garcia HM, Herrman J, Hoefler I, Jukema JW, Krams R, Kwak BR, Marx N, Naruszewicz M, Newby A, Pasterkamp G, Serruys PWJC, Waltenberger J, Weber C, Tokgözoğlu L. Stabilisation of atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost*. 2011;106:1-19
- 23) Gössl M, Versari D, Hildebrandt HA, Bajanowski T, Sangiorgi G, Erbel R, Ritman EL, Lerman LO, Lerman A. Segmental heterogeneity of vasa vasorum neovascularization in human coronary atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2010;3:32-40
- 24) Pellegrin M, Alonso F, Aubert JF, Bouzourene K, Braunersreuther V, Mach F, Haefliger JA, Hayoz D, Berthelot A, Nussberger J, Laurant P, Mazzolai L. Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development in hypertensive 2-kidney, 1-clip mice by modulating angiotensin II type 1 receptor expression independently from hemodynamic changes. *Hypertension*. 2009;53:782-9
- 25) Machal J, Vasku A, Hlinomaz O, Linhartova P, Groch L, Vitrovec J. Apolipoprotein E polymorphism is associated with both number of diseased vessel and extent of coronary artery disease in Czech patients with CAD. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2012;156: 151-158
- 26) Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, Tarin C, Mas S, Ortiz A, Edigo J. Animal model of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2011 In press
- 27) Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, Pedrazzini T. Two kidney, one clip and one kidney, one clip Hypertension in Mice. *Hypertension*. 1997;29:1025-1030
- 28) Naruko T, Ueda M, Haze K, van der Wal AC, van der Loos CM, Itoh A, Komatsu R, Ikura Y, Ogami M, Shimada Y, Ehara S, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002;106:2894-900
- 29) Van Leeuwen M, Gijbels M, Duijvestijn A, Smook M, van de Gaar MJ, Heeringa P, de Winther M, Cohen Tervaert JW. Accumulation of Myeloperoxidase-Positive neutrophils in Atherosclerotic Lesion in LDLR^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;1173:274-279

8. ANNEXES

Protocole de mise en culture des hybridomes produisant l'anticorps NIMP-R14 reconnaissant les antigènes de surface des neutrophiles de souris

Milieu de culture :

-RPMI +20% FCS+Pénicilline streptomycine (5ml/500ml milieu).

Atmosphère :

-37°C

-5 % CO₂

Récupération des anticorps NIMP-R14 produits par les hybridomes :

-Centrifugation des cellules + milieu de culture pendant 5 min à 800RPM

-Récupération du surnageant (contenant les anticorps) qui sera concentré par la suite

-Dilution du culot dans 1ml de milieu de culture

-Prélever 400µl du culot+ 1ml de milieu de culture et les diluer dans 20 ml de milieu

-comptage des cellules

-répartition des cellules dans des boites à raison de 500.000 cellules /10ml/boite T75cm²

Concentration des surnageants :

La concentration des échantillons se fait dans des colonnes (Amicon Ultracell 100K ; UFC 910024 Millipore, Suisse)

-Equilibrer la colonne avec un lavage au PBS 15ml et centrifuger 30min à 1500 RCF

-Jeter le liquide entré dans le tube car tous ce qui est inférieur à 30 000Da passe à travers la membrane. Les anticorps NIMP-R14 se trouvent donc dans le compartiment initial (IgG = 156000 daltons)

Les concentrés peuvent ainsi être réduits jusqu'à 300 µl

Purification du concentré :

- La purification se fait sur une colonne de chromatographie (ref 1536159 ; kit Biorad, Prot A affigel MAPSII Kit, Suisse)

- Laver la colonne et mettre 2ml de gel d'agarose (liant les IgG)
- Préparation d'une éprouvette contenant 3.2 ml de HCl

- Diluer 2x l'échantillon (volume de base) avec du Binding Buffer (BB) fournit dans le kit

- Equilibrer la colonne avec 5 volumes de base de BB afin d'obtenir un pH de 9 égal au BB

- Une fois la colonne équilibrée, faire passer l'échantillon dilué 2x

- L'écoulement terminé, rincer la colonne avec 15 volumes de base de BB

- Eluer les IgG contenus dans le gel d'agarose avec 5 volumes de base d'Elution Buffer fournit avec le kit et récupérer l'éluat dans l'éprouvette contenant le HCl.

- Rincer la colonne avec 5 volumes de base de Regeneration Buffer fournit lui aussi avec le kit

Protocole de marquage direct des neutrophiles dans le sang périphérique **chez la souris ApoE^{-/-}**

-Prélever environ 200µl de sang sur des tubes EDTA (300µl, Multivette® CD300K2E EDTA, Sarstedt, Germany) sur glace. Prise de sang rétro-orbitale par micropipette héparine (minicaps Hep, Hirschmann®, Germany)

-Pipetter le sang dans les tubes pour cytométrie de flux

-Lyse des érythrocytes : suspension du sang dans ~4 volumes (~1.5 mL) d'une solution NH₄CL (service d'hématologie du CHUV, Lausanne) pendant 10-15 min sur glace (jusqu'à transparence). Utilisation du vortex régulière afin d'éviter la formation d'un caillot.

-Centrifugation pendant 5min à 2000 RPM : vider le surnageant (leucocytes dans le culot)

-Laver les cellules : resuspension du culot dans 500µl PBS-BSA 0.1% (service d'hématologie du CHUV, Lausanne) puis centrifuger 5 min. à 2000 RPM et vider le surnageant

-Resuspension des cellules dans 500µl PBS-BSA 0.1% et comptage des cellules

-Répartir 100µl de cellules dans 2 tubes puis marquage avec anticorps (20 min, à l'abri de la lumière et sur glace) :

- Tube 1 : Anticorps rat anti-souris CD16/CD32 (BD Pharmingen, No 553141) pour bloquer les récepteurs Fc + anticorps FITC rat igG2b anti-souris isotopique contrôle. Utiliser 1 µl par tube pour 100 µl de suspension cellulaire.
- Tube 2 : Anticorps rat anti-souris CD16/CD32 + anticorps FITC rat IgG2b Ly-6G/Ly-6C pour marquer les neutrophiles. Utiliser 1µl par tube pour 100 µl de suspension cellulaire.

-Laver les cellules pour éliminer l'excès d'anticorps après le marquage: ajouter 500µl PBS-BSA 0.1%,. Centrifugation pendant 5min. à 2000 RPM et jeter le surnageant.

-Laver les cellules une 2^{ème} fois: ajouter 500µl PBS, centrifuger pendant 5min. à 2000 RPM et jeter le surnageant.

-Resuspendre les cellules dans 500µl de PBS puis faire les mesures avec le cytomètre.