

Mémoire de Maîtrise en médecine N° 5647

Effet d'un traitement combinant l'exercice sur tapis de course, l'atorvastatine, et le telmisartan sur la maladie oblitérante des membres inférieurs : Données préliminaires chez le modèle animal.

(Combined effect of treadmill running exercise, atorvastatin, and telmisartan in lower extremity artery disease: A preliminary study in the mouse model)

Etudiante

Déa Kuonen

Tutrice

Prof. Lucia Mazzolai

Service d'angiologie, Département cœur-vasseaux
Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)

Co-tuteur

DrSc. Maxime Pellegrin

Service d'angiologie, Département cœur-vasseaux
Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)

Expert

Dr. François Saucy

Service de chirurgie vasculaire, Département cœur-vasseaux
Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)

Lausanne, 14.12.2018

Introduction : L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) se caractérise par une sténose d'une artère des membres inférieurs consécutive à l'athérosclérose et se manifeste typiquement par des crampes au cours la marche qui altèrent la capacité de marche des patients. Plusieurs options thérapeutiques sont indiquées pour améliorer la capacité de marche: l'exercice structuré (ExS), les statines et les anti-hypertenseurs (antagoniste du récepteur de l'angiotensine II) ; toutefois, l'efficacité de la combinaison de ces trois traitements comparativement aux traitement seuls et les mécanismes d'action sous-jacents sont peu connus. **Objectif** : Examiner l'effet d'un traitement combinant l'ExS, une statine et un antagoniste du récepteur de l'angiotensine II sur la capacité de marche, la perfusion périphérique et le phénotype des monocytes et lymphocytes T au niveau systémique chez un modèle murin préclinique de l'AOMI. **Méthodes** : Le modèle murin d'AOMI a été généré chez des souris C57BL6 ApoE^{-/-} (modèle expérimental d'athérosclérose) via une ligature de l'artère iliaque commune droite. Les souris avec AOMI ont ensuite reçu un traitement combiné associant un ExS (course sur tapis roulant motorisé 40 minutes par jour, 3 fois/semaine), de l'atorvastatine (20 mg/Kg/day); et du telmisartan (20 mg/Kg/day) pendant 8 semaines. La capacité de marche a été déterminée par un test d'effort incrémental sur tapis roulant. La perfusion du membre inférieur ischémique a été évaluée par imagerie laser Doppler. La cytométrie de flux a été utilisée pour analyser le phénotype (pro-inflammatoire versus anti-inflammatoire) des monocytes et lymphocytes T dans la rate. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus chez des souris AOMI non traitées (groupe contrôle) et avec traitements seuls qui ont été générés dans un travail précédent. **Résultat** : Contrairement aux souris AOMI traitées avec atorvastatine seul et ExS seul, la capacité de marche n'a pas été améliorée chez les souris avec traitement combiné par rapport aux souris contrôles. La perfusion préphérique et le phénotype des monocytes et lymphocytes T ne sont pas significativement différents entre les souris AOMI avec traitement combiné et les autres groupes de souris. **Conclusion** : Notre étude pré-clinique suggère qu'une thérapie combinant l'ExS, l'atorvastatine et le telmisrtan n'est pas une approche thérapeutique pertinente pour le management de l'AOMI.

Table des matières

1. Remerciement.....	3
2. Abréviations.....	3
3. Introduction.....	4
4. Matériel et méthodes.....	11
5. Résultats.....	15
6. Discussion.....	21
7. Perspective.....	24
8. Bibliographie.....	25

1. Remerciement

Tout d'abord, je tiens à remercier mon co-tuteur, le Docteur en sciences de la vie Maxime Pellegrin pour sa patience, sa disponibilité, son encadrement et ses conseils avisés qui m'ont permis d'avancer et finaliser mon travail.

Je remercie ma tutrice, la Professeur Lucia Mazzolai, de m'avoir donné l'opportunité de faire mon travail de master en angiologie et de m'avoir aiguillé dans ma décision de choisir un travail de recherche fondamentale/expérimentale.

Je remercie aussi sincèrement le Docteur François Saucy d'avoir accepté et pris du temps d'expertiser ce mémoire.

Enfin, ma reconnaissance s'adresse à toutes les personnes sans qui la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible : Mme Diane Macabrey pour avoir pris le temps de m'introduire au laboratoire et pour son aide lors des expérimentations, Mme Mélanie Sipion pour son efficacité dans la gestion des données, Mme Jessica Lavier pour ces précieux conseils et toute l'équipe du laboratoire d'angiologie du CHUV qui m'a réservé un accueil chaleureux lors des mes expérimentations.

2. Abréviations

ACC :	Collège américain de cardiologie
AOMI :	Artériopathie oblitérante des membres inférieurs
ApoE :	Apolipoprotéine E
ARA-II :	Antagoniste du récepteur de l'angiotensine II
ATO :	Atorvastatine
ATS :	Athérosclérose
CI :	Claudication intermittente
CLTI :	Ischémie critique chronique
CON :	Contrôle
CV :	Cardiovasculaire
ECA :	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ESC :	Société européenne de cardiologie
EX :	Exercice
ExS :	Exercice supervisé
HDL :	Lipoprotéine de haute densité
IFN- γ :	Interféron-gamma
IGF-1 :	Facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline
IL-4, 19, 12, 13, 17 :	Interleukine
ITB :	Index tibio-brachial
LDL :	Lipoprotéine de basse densité
MWD :	Distance de marche maximale
MWDTE :	Distance de marche maximale jusqu'à épuisement
MWT :	Temps de marche maximal
PAD :	Artériopathie périphérique
PBS :	Phosphate buffer saline
PFWD :	Distance de marche sans douleur
PPAR :	Récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes
RAA :	système rénine-angiotensine-aldostérone
PAS :	Pression artérielle systolique
TEL :	Telmisartan
TGF- β :	Facteur de croissance transformant-bêta
VLDL :	Lipoprotéine de très basse densité

3. Introduction

3.1. Définition

L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) se caractérise par des plaques d'athérosclérose (ATS) qui occluent les artères dans les membres inférieurs entraînant une diminution du flux sanguin dans les tissus en aval. La manifestation clinique typique est la claudication intermittente (CI) qui se manifeste par une douleur apparaissant principalement dans le mollet durant la marche et qui s'estompe à l'arrêt de l'effort. Cette symptomatologie diminue la capacité de marche du patient ce qui affecte grandement sa qualité de vie.

L'AOMI est un problème de santé publique majeur qui touche plus de 200 millions de personnes dans le monde. Sa prévalence augmente avec l'âge et dépasse les 20% chez les personnes âgées de plus de 80 ans (1).

Les facteurs de risque sont semblables à ceux des autres maladies cardiovasculaires (CV), dont les principaux sont les antécédents familiaux (génétique et facteurs environnementaux), la sédentarité, le tabagisme, le diabète mellitus, le taux de lipoprotéine de basse densité (LDL)-cholestérol sanguin, le surpoids et l'hypertension artérielle (1).

L'AOMI est une sous-classification d'une entité plus globale qui est l'artériopathie périphérique (PAD). La PAD peut toucher toutes les artères périphériques du corps, notamment les artères carotidiennes, rénales, mésentériques, des membres supérieurs et inférieurs (**Figure 1**). L'ATS étant une maladie systémique, les patients avec une AOMI présentent souvent des plaques athéromateuses dans d'autres territoires artériels (coronaires, carotides) et ont, par conséquence, un risque de morbidité et mortalité CV augmenté (infarctus myocardique, accident vasculaire cérébral) (1).

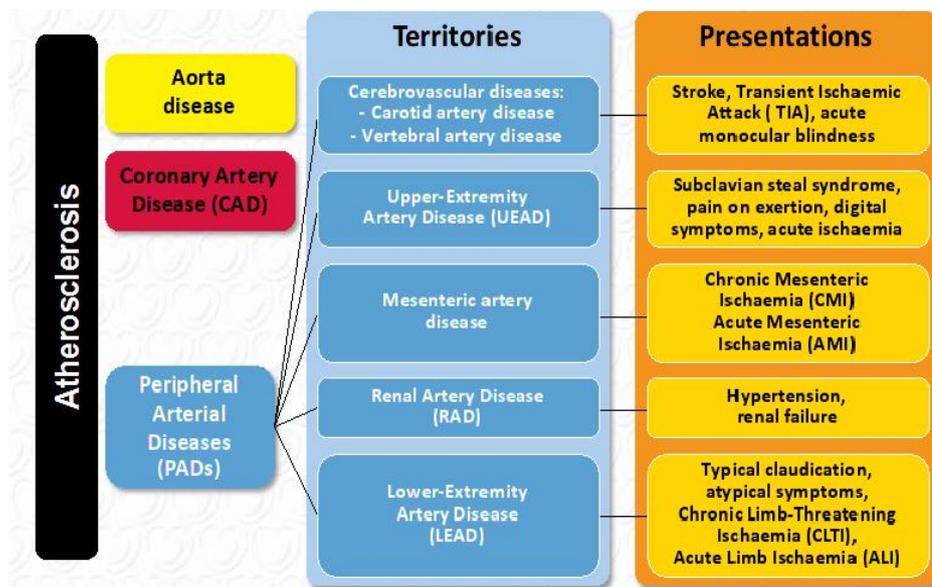


Figure 1: Présentations de la PAD (1)

3.2. Physiopathologie

L'ATS est la principale condition physiopathologique à l'origine de l'AOMI. Elle se caractérise par des plaques d'athérome qui se composent, entre autres, de cellules inflammatoires, de cristaux de cholestérol, de cellules musculaires lisses et de tissu fibreux. Dans l'AOMI, ces plaques se localisent dans l'intima des artères iliaques, fémorales, tibiales ou pédieuses, créant une occlusion plus ou moins importante de la lumière vasculaire et diminuant le débit sanguin dans le membre. Par conséquent, l'apport d'oxygène et de nutriments des tissus en aval de la lésion est diminué, notamment dans les muscles et en particulier lors d'une augmentation des besoins comme durant un effort physique.

Toutefois, il est à ce jour clairement établi dans la littérature scientifique que la baisse de la perfusion n'explique pas à elle seule l'incapacité fonctionnelle du patient et que d'autres mécanismes, principalement au niveau musculaire, sont impliqués. Ces mécanismes mis en évidence chez le patient et/ou chez le modèle animal ont été récemment décrits par Sfyri P & Matsakas A (2).

Ainsi, au niveau musculaire, ces changements peuvent être résumés comme suit : 1. un stress oxydatif, 2. une inflammation, 3. une mitochondriopathie, 4. une dégénérescence et une fibrose des fibres musculaires, et 5. une apoptose. La combinaison de ces différentes altérations biochimiques et pathophysiologiques impacterait la structure, la fonction et l'homéostasie du muscle et donc sa capacité à générer de la force, ce qui pourrait être une des causes de l'altération de la capacité de marche et de la qualité de vie du patient. Ces différents mécanismes sont illustrés dans la **Figure 2**.

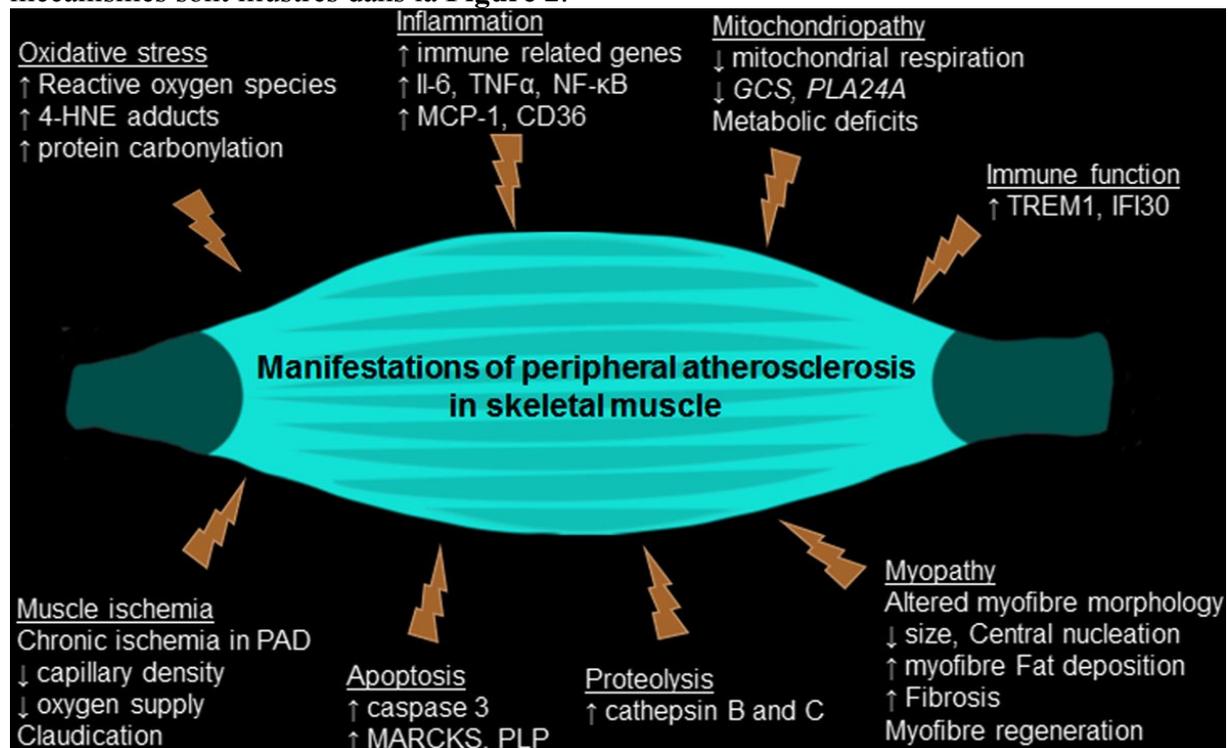
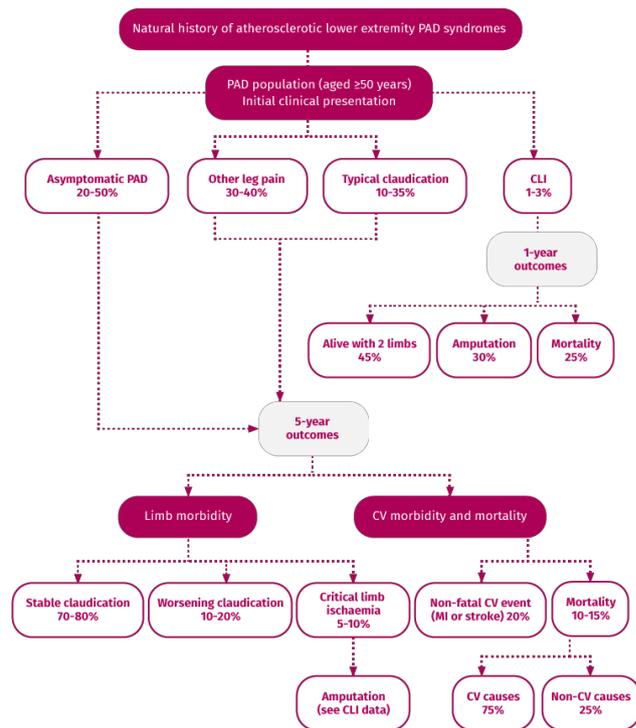


Figure 2 : Impact de l'ATS périphérique sur la structure, la fonction et l'homéostasie métabolique du muscle squelettique. 4-HNE adducts : 4-hydroxy-2nonenal adducts ; CD36 : cluster of differentiation 36 ; GCS : glycine cleavage systeme protein H ; IFI30 : gamma-interferon-inducible-lysosomal thiol reductase ; IL-6 : nterleukin-6 ; MARCKS : myristoylated alanine-rich C kinase substrate ; MCP1 : monocyte chemotactic protein 1 ; NF- κ B : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ; PLA24A : phospholipase A2 group IVA ; PLP : phopholipid transfer protein ; TNF- α : tumor necrosis factor-alfa ; TREM1 : triggering receptor expressed on myeloid cell 1. (2)

3.3. Symptômes

Les symptômes cliniques sont variables d'un patient à l'autre, même à un stade identique de la maladie. Le symptôme clinique typique est la CI, qui se traduit par une faiblesse, un inconfort, une douleur crampiforme dans les muscles squelettiques des membres inférieurs liée à la diminution de l'oxygénation des tissus et des muscles à l'effort, en particulier au cours de la marche. La douleur force le patient à stopper son effort. Elle cesse systématiquement après quelques minutes de repos dans les stades précoces de la maladie. La CI réduit donc la capacité de marche des patients (1). En comparaisant avec les personnes du même âge sans AOMI, les patients AOMI avec CI ont une réduction du périmètre de marche d'environ 50% (1). Ces personnes ont également un taux de mortalité CV de 10 à 15% dans les 5 ans (**Figure 3**).



CLI, critical limb ischaemia; CV, cardiovascular; PAD, peripheral artery disease
 Norgren L et al - Inter-Society Consensus for the Management of PAD (TASC II), J Vasc Surg 2007;45:55-567

www.thrombosisadviser.com

Figure 3: Présentation clinique et évolution naturelle de l'AOMI (3)

Bien que la CI soit typique de l'AOMI, celle-ci ne se manifeste que chez un tiers des patients. L'AOMI peut se présenter sous forme de douleurs atypiques qui peuvent être ressenties au repos ou qui n'empêchent pas le patient de marcher. La majorité des patients avec AOMI reste cependant asymptomatique même à des stades avancés de leur maladie. Ceci est souvent le cas quand les patients ne parviennent pas à marcher assez longtemps pour que les symptômes apparaissent (notamment en cas de problème cardiaque ou de neuropathie diabétique). Ces patients appartiennent alors au sous-groupe appelé « AOMI masquée ». Ce sous-groupe passe souvent rapidement d'une AOMI asymptomatique à une AOMI sévère (1).

Fontaine classification	
Stage	Symptoms
I	Asymptomatic
II	IIa Non-disabling intermittent claudication
	IIb Disabling intermittent claudication
III	Ischaemic rest pain
IV	Ulceration or gangrene

Figure 4: Classification de l'AOMI selon Leriche et Fontaine (1)

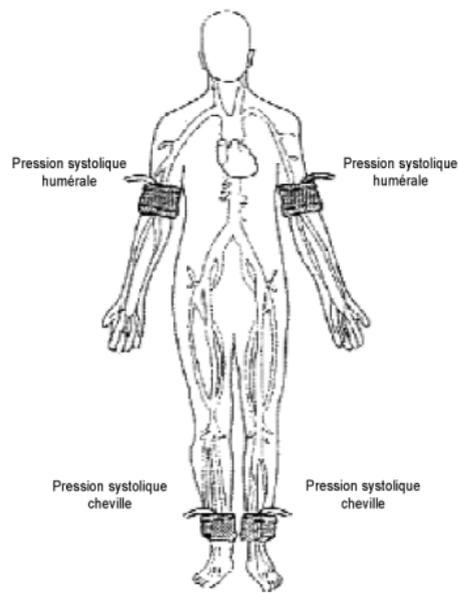
La classification de Leriche et Fontaine stratifie la gravité des symptômes en 4 grades. La CI correspond au stade IIa et IIb (Figure 4). On différencie le stade IIa et IIb par la distance de marche que le patient arrive à parcourir avant l'apparition de la douleur : plus de 200 mètres pour le stade IIa et moins de 200 mètres pour le stade IIb (4). Chaque année, chez 1 à 2 % des patients AOMI, la CI évolue vers une ischémie critique chronique persistante (CLTI) (Figure 3). La CLTI est la forme la plus sévère d'AOMI et correspond aux stades III et IV de la classification (Figure 4). Elle est définie par la présence d'une douleur ischémique au repos avec ou sans perte de tissus (ulcère, gangrène). Trente

pour cent de ces patients doivent subir une amputation et 25% ont une espérance de vie d'une année (**Figure 3**) (5).

3.4. Diagnostic

La mesure de l'index tibio-brachial (ITB) est le test de première intention pour le dépistage et le diagnostic de l'AOMI. L'ITB mesure le degré de sténose et la rigidité des artères. Cette méthode est non-invasive et bien tolérée par les patients. On obtient cet index en divisant la pression artérielle systolique (PAS) de chaque cheville par la PAS humérale la plus élevée (**Figure 5a**). Un ITB inférieur à 0.9 permet de diagnostiquer une AOMI avec une sensibilité de 75% et une spécificité de 86% (1). Selon la valeur de l'ITB, on peut classer la sévérité de l'AOMI : plus l'ITB est bas, plus l'AOMI est sévère (**Figure 5b**). Sa sensibilité se voit réduite chez les patients avec un diabète avancé ou une insuffisance rénale chronique. Dans ces cas de figure, la valeur de l'ITB est généralement supérieure à 1.40, ce qui indique une calcification de la media. D'autres investigations sont alors nécessaires, comme par exemple la mesure de la PAS aux orteils. Un ITB normal n'exclue pas complètement le diagnostic et un ITB post-exercice et/ou une échographie Doppler peuvent alors être utiles. L'échographie Doppler est l'imagerie de première intention pour détecter, localiser, et quantifier l'extension des lésions. L'imagerie doit cependant toujours être couplée à un test hémodynamique, et être corrélée avec les symptômes du patient. Les autres modalités d'imagerie, comme le angio-CT, l'angio-IRM ou encore l'angiographie conventionnelle sont surtout utilisées quand une revascularisation est envisagée (1).

Etant donné que la majorité des patients sont asymptomatiques, il est important de dépister activement la capacité de marche. Le test de marche sur tapis roulant (pente de 10% et 3 km/h) est un excellent moyen pour objectiver la limite fonctionnelle et diagnostiquer les sténoses modérées chez les patients qui n'ont pas d'ITB pathologique. Ce test permet de déterminer la distance maximale de marche (MWD) et le temps maximal de marche (MWT) qui correspondent respectivement à la distance et au temps que le patient peut marcher, sur le tapis roulant, avant que les douleurs soient telles qu'elles l'empêchent de continuer son effort. Le test sur tapis permet également de déterminer la distance de marche sans douleur (PFWD). Après l'exercice, une diminution de la PAS tibiale de >30mmHg ou une diminution de l'ITB de >20% permet de confirmer le diagnostic d'AOMI (1). La démarche diagnostique détaillée est décrite dans la **Figure 6**.



$$ABI = \frac{\text{Pression systolique cheville droite}}{\text{Pression systolique humérale la plus élevée}}$$

$$ABI = \frac{\text{Pression systolique cheville gauche}}{\text{Pression systolique humérale la plus élevée}}$$

Figure 1 Mesure de l'ankle brachial index

La mesure de l'ABI d'un membre inférieur est le quotient de la pression systolique à la cheville par la pression systolique humérale la plus élevée. C'est la valeur de l'ABI la plus faible qui détermine le niveau de risque cardiovasculaire du patient.

ABI	Interpretation
> 1.3	False elevation; heavy vessel calcification
1.0–1.29	Normal
0.91–1.0	Borderline
0.7–0.9	Mild PAD
0.4–0.69	Moderate PAD
< 0.4	Severe PAD, associated critical limb ischemia (ulceration and rest pain)

Figure 5a (droite) et 5b (gauche) : Mesure et classification du ITB (6)

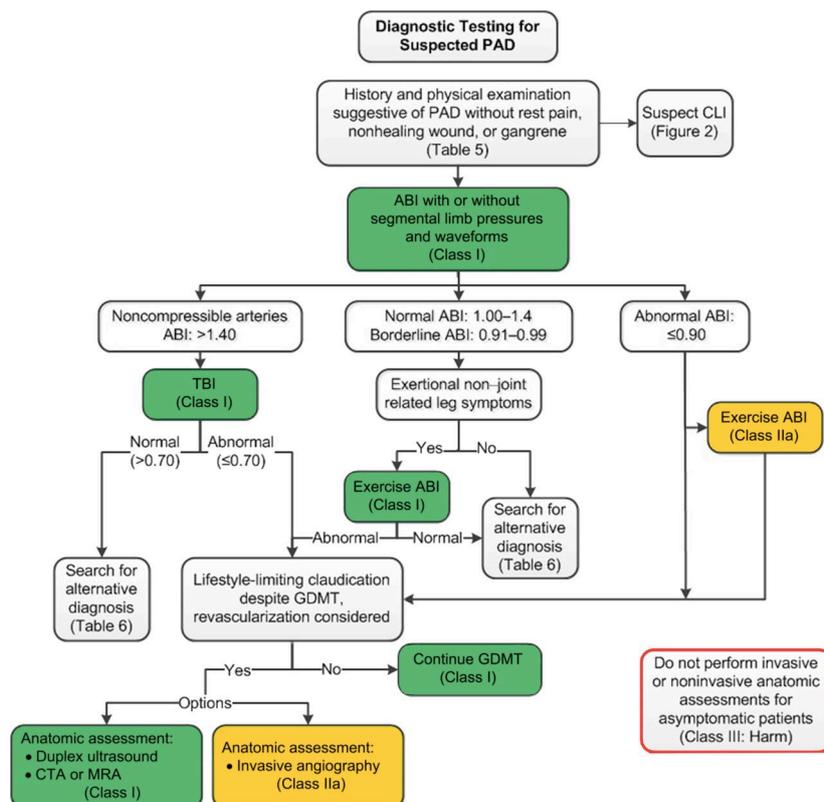


Figure 6 : Plan schématique du diagnostic de la PAD. PAD : peripheral artery disease ; CLI : chronic limb ischemia ; ABI : ankle-brachial-index ; TBI : toe-brachial-index ; GDMT : guideline-directed management and therapy ; CTA : computed tomography angiography ; MRA : magnetic resonance angiography. Vert : degré de recommandation I, niveau d'évidence A, Jaune : degré de recommandation II, niveau d'évidence A (7).

3.5. Traitement actuel

Les objectifs du traitement chez les patients AOMI sont d'une part d'améliorer la capacité de marche et d'autre part de réduire le risque CV. Dans ce travail, nous allons nous concentrer uniquement sur les traitements recommandés pour améliorer spécifiquement la capacité de marche. Les traitements qui visent à réduire le risque CV sont détaillés dans les recommandations internationales (1,7).

Les différents traitements pharmacologiques et non-pharmacologiques qui ont montré un bénéfice sur la capacité de marche sont l'exercice supervisé (ExS), la pharmacothérapie et la revascularisation (1,7) comme détaillés ci-dessous.

3.5.1. Exercice supervisé

La Société Européenne de Cardiologie (ESC) et le Collège Américain de Cardiologie (ACC), recommandent l'ExS chez tous les patients AOMI avec CI comme traitement de 1^{ère} intention (degré de recommandation I, niveau d'évidence A) (**Tableau 1**).

En effet, de nombreuses publications ont démontré l'efficacité de l'ExS pour améliorer la capacité de marche. Le bénéfice de l'ExS a notamment été décrit dans une récente méta-analyse de la revue Cochrane incluant 32 études randomisées contrôlées (1835 patients avec IC) (8). Les études incluses proposaient des protocoles d'ExS d'une durée de 3 à 12 mois avec au minimum 2 entraînements par semaine mais sans critères d'inclusion stricts sur le type/mode d'entraînement ou la durée totale du programme. Cette revue montre une amélioration de la MWD de 120.4 mètres et du temps de marche maximal (MWT) de 4.5 minutes chez des patients après un ExS comparés aux patients qui n'ont pas suivi un ExS. A noter que cette amélioration persiste en moyenne 3 mois après la fin de l'ExS, et parfois même pendant plus d'une année (8).

Ces résultats viennent confirmer une précédente méta-analyse publiée en 2012 incluant 1054 patients de 25 études randomisées contrôlées où une amélioration significative de la MWD de 180 mètres avait été reportée. Dans cette méta-analyse, les protocoles d'entraînement ont duré de 1 à 26 mois, avec comme mode d'exercice de la marche ou de la marche avec des exercices de musculation divers (des membres supérieurs et/ou des membres inférieurs) (9).

Les caractéristiques de l'ExS préconisé par les guidelines sont : la marche supervisée (degré de recommandation I, niveau d'évidence A), minimum 3 entraînement de 30-45 minutes par semaine, pendant 3 mois au minimum. L'entraînement est réalisé de préférence en milieu hospitalier. Il débute par un échauffement suivi de l'entraînement en tant que tel et se termine par une récupération active. L'intensité de l'entraînement doit être telle que les douleurs musculaires surviennent après 3-5 minutes d'effort. L'entraînement à la marche est ensuite repris après l'atténuation de la symptomatologie par le repos. Un protocole d'exercice non-supervisé mais structuré et élaboré par des professionnels de la santé peut également être proposé aux patients comme alternative à l'ExS (degré de recommandation I, niveau d'évidence C). Ce type d'entraînement peut être réalisé « à la maison », avec des caractéristiques similaires au protocole d'ExS. Le patient le fait en autonomie mais avec un suivi.

Les caractéristiques détaillées des programmes d'exercice supervisé et non-supervisé sont détaillées dans le **Tableau 1**.

Si la marche n'est pas possible, elle peut être remplacée par du vélo ou des exercices des membres supérieures qui ont aussi prouvé leur efficacité (1).

Supervised exercise program (COR I, LOE A)

- Program takes place in a hospital or outpatient facility.
- Program uses intermittent walking exercise as the treatment modality.
- Program can be standalone or within a cardiac rehabilitation program.
- Program is directly supervised by qualified healthcare provider(s).
- Training is performed for a minimum of 30–45 min/session; sessions are performed at least 3 times/wk for a minimum of 12 wk.
- Training involves intermittent bouts of walking to moderate-to-maximum claudication, alternating with periods of rest.
- Warm-up and cool-down periods precede and follow each session of walking.

Structured community- or home-based exercise program (COR II, LOE A)

- Program takes place in the personal setting of the patient rather than in a clinical setting.
- Program is self-directed with guidance of healthcare providers.
- Healthcare providers prescribe an exercise regimen similar to that of a supervised program.
- Patient counseling ensures understanding of how to begin and maintain the program and how to progress the difficulty of the walking (by increasing distance or speed).
- Program may incorporate behavioral change techniques, such as health coaching or use of activity monitors.

Tableau 1 : Caractéristiques des entraînements supervisés et non-supervisés pour les patients avec AOMI (7,8).
COR : degré de recommandation, LOE : niveau d'évidence.

3.5.2. Pharmacothérapie

3.5.2.1. Statine

Dans les recommandations actuelles de la ESC et du ACC, les statines sont indiquées chez tous patients AOMI (degré de recommandation I, niveau d'évidence A) pour améliorer le pronostic CV mais également pour améliorer la capacité de marche (1).

Cette recommandation est basée sur diverses études dont une étude randomisée, en double aveugle, incluant 354 patients avec claudication intermittente, qui a montré une amélioration du temps de marche maximal sans douleur de 63% chez les patients avec CI traités par une dose d'atorvastatine (ATO : 80 mg/jour) durant 12 mois par rapport à 38% d'amélioration dans le groupe placebo (10).

De la même manière, l'étude de Mondillo et al. (2003) (étude randomisée contrôlée en double aveugle incluant 86 patients avec AOMI) a montré une amélioration de la MWD de 126 mètres du groupe simvastatine (40 mg/jour) par rapport au groupe placebo à 6 mois (11). Une récente étude comparative prospective multicentrique non randomisée et incluant 75 patients AOMI, a également montré une amélioration de la capacité de marche (MWD et PFW) après 6 mois de traitement par pitavastatine (dose individualisée) (12).

3.5.2.2. Antihypertenseur

Un effet bénéfique sur la capacité de marche de certains antihypertenseurs chez des patients AOMI hypertendus a été démontré durant ces dernières années.

Par exemple, une étude randomisée en double aveugle et contrôlée, incluant 44 patients avec CI (Fontaine stade II), a montré une amélioration de la MWD (+49%) après un traitement de 4 semaines par Verapamil (dose optimale individualisée selon les valeurs de PAS des patients) comparé aux patients qui ont reçu un placebo (13). Une autre étude publiée en 2010 en simple aveugle incluant 36 patients AOMI avec une CI et une hypertension modérée a démontré que les patients traités avec du telmisartan (TEL ; 40 mg/jour ou 80 mg/jour en cas de PAS >150mmHg), un antagoniste du récepteur de l'angiotensine II (ARA-II) ont une MWD améliorée de 26% (191 mètres) après 12 mois de traitement, comparé au groupe placebo (14).

3.5.2.3. Autres drogues

Le cilostazol, le naftidrofuryl, la pentoxifylline, le buflomedil, la carnitine et la propionyl-L-carnitine sont les médicaments les plus étudiés dans le contexte de la CI bien que leurs effets sur la capacité de marche sont modestes et très variables (1).

3.5.3. Revascularisation

La revascularisation (endovasculaire, chirurgie ou hybride selon la localisation et l'extension des lésions artérielles) est réalisée en cas d'échec des traitements conservateurs que nous venons de détailler et devrait toujours se faire en combinaison avec l'ExS. Pour plus de détails sur la revascularisation chez le patient avec CI, se référer aux recommandations de l'ESC et de l'ACC (1,7).

3.6. Objectif de l'étude

Comme nous venons de le décrire, il existe de multiples options thérapeutiques pour améliorer la capacité de marche chez le patient avec AOMI et CI. Toutefois, le traitement optimal n'a pas encore été identifié et la combinaison de plusieurs traitements pourrait être une approche thérapeutique prometteuse.

Si l'ExS, les statines et, dans une moindre mesure, les antihypertenseurs ont des effets bénéfiques sur la capacité de marche, aucune étude n'a investigué, à notre connaissance, l'effet additionnel ou synergique de la combinaison de ces trois traitements dans l'AOMI.

L'objectif de cette étude a donc été d'évaluer l'effet d'un traitement combinant l'ExS, une statine et un antihypertenseur sur la capacité de marche mais également sur la perfusion périphérique et le phénotype des monocytes et des lymphocytes T au niveau systémique. Pour répondre à notre objectif, nous avons réalisé notre étude chez un modèle murin préclinique de l'AOMI et CI.

4. Matériel et méthodes

4.1. Génération du modèle murin d'AOMI et CI

L'AOMI étant principalement secondaire à l'ATS comme décrit préalablement, nous avons donc généré notre modèle chez des souris C57BL/6 Apolipoprotéine E knock-out (ApoE^{-/-}), un modèle bien établi d'hypercholestérolémie et d'ATS humaine (15).

Pour notre étude, l'AOMI a été modélisée par une ligature chirurgicale de l'artère iliaque commune droite comme préalablement détaillé dans une de nos publications (16). L'étude a été réalisée chez des souris mâles ApoE^{-/-} âgées de 10 semaines.

Brièvement, chaque souris a été anesthésiée par inhalation d'isoflurane, et positionnée en supination sur une plaque chauffante électrique pour maintenir la température corporelle aux alentours de 37°C. Une fois la souris anesthésiée, les poils de la partie interne de sa patte droite ont été enlevés avec une crème dépilatoire (SurgexTM, Cooper Cosmetics SA, Suisse) et la peau sous-jacente désinfectée par une solution aqueuse de Chlorhexidine 0.5%[®]. Après une petite incision au niveau de l'abdomen, l'artère iliaque commune droite a été individualisée et ligaturée en utilisant du fil de soie non-résorbable 7-0 (Deknatel[®]). L'incision a ensuite été suturée avec du fils de suture résorbable 5-0 (Vicryl[®]). Du Bepanthen Plus[®] spray a été appliqué pour désinfecter la plaie et favoriser la cicatrisation.

Les souris ont reçu de l'analgésie en post-opératoire selon le schéma suivant : Dafalgan[®] (200 mg/kg/jour dans l'eau de boisson) durant 1 semaine, et du Temgesic (0.1 mg/kg/jour par injection sous-cutanée) à 24 et 48 heures après l'opération. Aucune investigation n'a été réalisée la semaine qui a suivi la chirurgie, afin de permettre aux souris de récupérer.

Pour « valider » notre modèle d'AOMI, la capacité de marche et la perfusion périphérique de chaque souris ont été évaluées avant la ligature artérielle et 1 semaine après la ligature (avant le commencement des différents traitements : voir les détails du protocole (**Figure 7**). Comme attendu, la capacité de marche a été significativement diminuée après la chirurgie (269.7 ± 126.6 mètres 1 semaine après la ligature artérielle versus 954.0 ± 301.8 mètres avant la ligature ; $p < 0.0001$). De même, la perfusion cutanée de la patte opérée (exprimée en % de la perfusion de la patte controlatérale non opérée) a également été diminuée de manière significative après la ligature artérielle ($26.0 \pm 6.2\%$ 1 semaine après la ligature versus $97.0 \pm 4.0\%$ avant la ligature artérielle ; $p < 0.0001$). Ces résultats indiquent que nos souris opérées présentent une capacité de marche altérée et une ischémie chronique du membre inférieur comme préalablement reporté dans notre laboratoire (16).

4.2. Provenance et hébergement des souris

Les souris ApoE^{-/-}, initialement achetées chez Jackson laboratory (Bar Harbor, USA), ont été reproduites et élevées dans l'animalerie du Département de Pharmacologie et de Toxicologie (service commun des animaleries FBM/UNIL-CHUV). Les souris ont ensuite été transférées à notre animalerie (Nestlé 06, CHUV) environ 2 semaines avant le début des expériences. Les souris ont été hébergées dans des cages ventilées (Mouse IVC Library System, Techniplast, Italie) en cycle jour/nuit de 12h/12h (éclairage de 7h à 19h) avec une température ambiante contrôlée ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Une nutrition standard (Provimi Kliba, Suisse) et de l'eau (avec ou sans médicament : voir chapitre suivant) ont été mis à disposition ad libitum durant toute l'étude.

Toutes les expériences ont été réalisées selon les recommandations fédérales Suisses (Principes éthiques pour l'expérimentation animale) et approuvées par le service de la consommation et des affaires vétérinaires du canton de Vaud (SCAV ; autorisation VD3226). Tous les efforts ont été mis en œuvre pour minimiser la souffrance animale et le nombre d'animaux utilisés. Les souris ont été inspectées quotidiennement et pesées tous les 2 jours durant toute la période d'expérimentation. La santé et le bien-être des animaux ont également été évalués.

4.3. Design de l'étude et groupes expérimentaux

Les souris ApoE^{-/-} ont été randomisées en 4 groupes comme suit :

- Groupe 1 : contrôles (**CON**, n=6) : les souris n'ont reçu aucun traitement.
- Groupe 2 : exercice (**EX**, n=4) : les souris ont suivi un protocole de course structuré sur tapis roulant 3 fois par semaine comme détaillé dans le **Tableau 2**:

Durée	Vitesse	Intérêt
5 minutes	8 cm/sec	Echauffement
5 minutes	15 cm/sec	Echauffement
50 minutes	20 cm/sec pour les quatre premières semaines d'entraînement puis 22 cm/sec pour les quatre dernières semaines entraînements	Effort
5 minutes	8 cm/sec	Récupération active

Tableau 2 : Caractéristiques du programme d'entraînement réalisé par les souris avec AOMI.

Les souris ont été entraînées à 75% de leur vitesse maximale aérobie, ce qui correspond à une intensité d'entraînement modérée comme préalablement décrit (17).

La vitesse maximale aérobie a été évaluée par un test d'effort incrémental sur tapis roulant comme détaillé au chapitre : 4.6. (18).

- Groupe 3 : Atorvastatine (ATO, n=5) : les souris ont été traitées avec de l'Atorvastatine (Sortis[®] tablettes, Pfizer PFE GmbH, Zürich) à une dose de 20mg/kg/jour.
- Groupe 4 : Telmisartan (TEL, n=5) : les souris ont été traitées avec du Telmisartan (Micardis[®] tablettes, Boehringer Ingelheim GmbH Basel) également à une dose de 20mg/kg/jour (19).
- Groupe 5 : combinaison des 3 traitements (EX+ATO+TEL, n=5) : les souris ont suivi le même protocole d'EX que le groupe 1, tout en étant traitées avec de l'ATO et du TEL de manière identique aux groupes 3 et 4.

L'ATO et le TEL ont été administrés par voie orale dans l'eau de boisson. Les tablettes ont été préalablement écrasées et broyées avec un potter et diluées directement dans l'eau de boisson. Les drogues ont été préparées et renouvelées tous les 2 jours.

Pour cette étude, j'ai expérimenté uniquement les souris du groupe traitement combiné (EX+ATO+TEL). Les groupes CON, EX, ATO et TEL ont été expérimentés dans le cadre d'un projet de master en biologie (mémoire de Mme Diane Macabrey, faculté de biologie et médecine, UNIL, janvier 2018).

Le design de l'étude est détaillé dans la figure suivante (Figure 7).

Au total, le protocole a duré 10 semaines. Les traitements ont débuté 1 semaine post-chirurgie et ont duré 8 semaines.

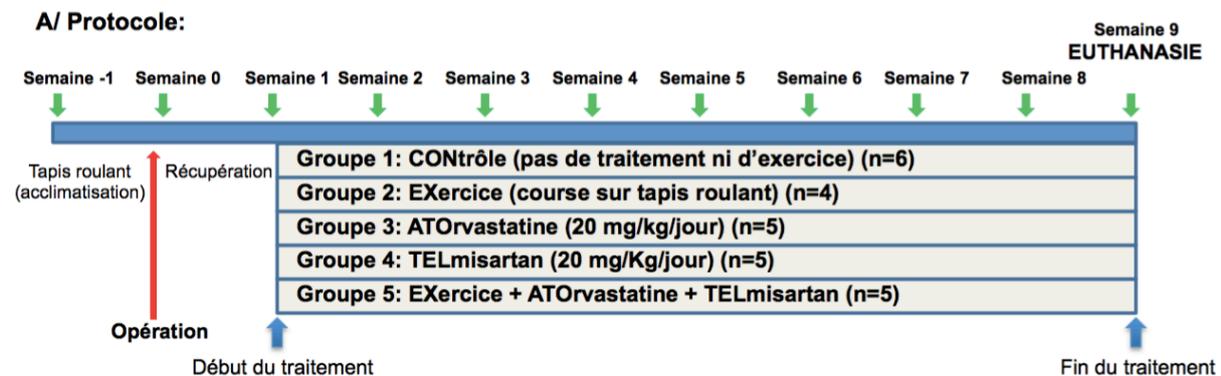


Figure 7 : Protocole expérimental.

4.4. Ponction cardiaque et prélèvement des tissus

A la fin de l'étude (8 semaines post-traitement), les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane. Le sang a été lentement prélevé avec une seringue de 1 mL (Omnifix[®], Braun, Suisse) après introduction d'une aiguille stérile (25G, BD microlance) dans le cœur, puis récupéré dans un tube contenant de l'anticoagulant EDTA (Multivette[®] CD300K2E EDTA, Sarstedt, Allemagne). Pour récupérer le plasma sanguin, les tubes Multivette[®] contenant le sang ont été centrifugés 10 minutes à 2500 rotations par minute. Les échantillons de plasma ont été finalement stockés à -80°C jusqu'aux analyses.

Immédiatement après la ponction cardiaque, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale.

La rate a ensuite été prélevée après une excision au niveau du flanc latéral gauche de l'animal, puis coupée en deux parties sur une boîte de Pétri stérile : la première partie a été stockée dans du milieu de culture cellulaire RMPI jusqu'à la préparation de l'échantillon pour l'analyse par cytométrie de flux (cf. chapitre 4.7. ci-dessous) tandis que la deuxième partie a été congelée

dans de l'azote liquide et stockée à -80°C pour des analyses ultérieures de biologie moléculaire (non présentées dans ce mémoire) .

D'autres tissus ont été prélevés (aortes, cœurs, muscles gastrocnémiens de la patte) pour des analyses ultérieures également non présentées dans ce mémoire.

4.5. Imagerie laser Doppler

La perfusion sanguine microcirculatoire de la patte opérée/ischémique (droite) et de la patte controlatérale non-opérée/non-ischémique (gauche) a été mesurée par un laser Doppler imageur (Moor Instruments, Axminster, UK) comme préalablement décrit (16) avant le commencement des traitements (pré-traitement) puis toutes les 2 semaines jusqu'à fin de l'étude (semaine 8 post-traitement).

Brièvement, les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane et placées sur une plaque chauffante en pronation durant toutes les mesures de perfusion pour maintenir la température corporelle. Après une période de stabilisation de 10 minutes, 6 mesures consécutives du flux sanguins distal de la patte ischemique et de la patte non ischemique controlatérale ont été réalisées. La quantification du flux sanguin en unités arbitraires a été réalisée pour chaque mesure grâce au logiciel Moor LDI Image Review (version 5.2). Les résultats de perfusion de la patte ischemique ont été exprimés en pourcentage de perfusion de la patte controlatérale afin de minimiser les biais environnementaux pendant les mesures (lumière et température ambiantes) et interindividuelles (chaque animal est ainsi son propre contrôle).

4.6. Test incrémental sur tapis roulant

La capacité de marche de chaque souris (distance maximal de marche jusqu'à épuisement, MWDTE) a été déterminée en utilisant un test incrémental sur tapis roulant motorisé (Panlab, LE-8700, Bioseb, France) effectué à pré-traitement, puis à 4 semaines et à 8 semaines post-traitement. Le test s'est déroulé comme suit : 5 minutes d'échauffement à une vitesse de 8 cm/sec, puis augmentation de la vitesse de 2 cm/sec chaque 3 minutes jusqu'à épuisement. Les souris ont été encouragées à courir par des stimuli électriques délivrés par une grille électrique située à l'arrière du tapis roulant (0.2mA). Les souris étaient considérées épuisées quand elles montraient des difficultés à courir sur la base des critères d'interruption suivants : immobilisation sur la grille électrique pendant plus de 3 sec consécutives ou réception de 100 chocs électriques au total sur toute la durée du test.

Les souris ont été acclimatées au tapis roulant durant 4 jours consécutifs avant le 1^{er} test incrémental (10 minutes par jour à une vitesse de 8 cm/sec les 2 premiers jours puis 10 cm/sec les 2 jours suivants). Ce protocole a été récemment publié (16).

4.7. Cytométrie de flux

L'identification et la quantification des lymphocytes T auxiliaires, lymphocytes T auxiliaires Th1, Th2 et Th17, des lymphocytes T régulatrices (T regs) des monocytes et des sous-populations monocytaires pro-inflammatoires, intermédiaires et anti-inflammatoires présents dans la rate ont été réalisées par cytométrie de flux, selon un protocole légèrement modifié (20).

Les principales étapes du protocole peuvent être résumées comme suit: la rate est d'abord écrasée et broyée à l'aide d'un piston de seringue à travers un tamis cellulaire (70 µm) afin d'obtenir une suspension cellulaire homogène de splénocytes. Pour l'analyse des lymphocytes T auxiliaires (définis comme CD4⁺), Th1 (définis comme CD4⁺ IFN-γ⁺), Th2 (définis comme CD4⁺ IL-4⁺) et Th17 (définis comme CD4⁺ IL-17⁺), les cellules sont stimulées avec un cocktail contenant notamment de la ionomycine et du phorbol-myristate-acétate (PMA) (afin de stimuler une réponse immunitaire) en présence de Golgi Stop (pour amplifier la détection

de cytokines produites par les cellules) et incubées durant 5 heures à 37°C. La production d'interféron-gamma (IFN- γ), d'interleukine-4 (IL-4) et d'interleukine-17 (IL-17) est déterminée après un marquage intracellulaire, fixation et perméabilisation des cellules. Pour analyser des T regs (définis comme CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺), les cellules sont fixées et perméabilisées après un marquage intracellulaire et ensuite marquées avec l'anti-corps anti-Foxp3.

Pour l'analyse, des monocytes (CD11b⁺, Ly6G⁻), des monocytes pro-inflammatoires (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}), intermédiaires (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{medium}) et anti-inflammatoires (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{low}), les cellules ont été marquées avec les anticorps de surfaces appropriés.

L'analyse a été faite dans les cellules vivantes (différenciées des cellules mortes à l'aide du marquage par le kit LIVE/DEAD® cell viability assay, ThermoFisher, Suisse) en utilisant un cytomètre de flux Beckman Coulter Gallios (Laboratoire central d'hématologie, CHUV). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

Les différents anticorps utilisés pour ces analyses et les détails de la procédure pour cette analyse peuvent faire l'objet d'une demande au laboratoire du service d'angiologie.

4.8. Mesure non invasive de la PAS

La PAS a été mesurée à 8 semaines post-traitement au niveau de la queue des souris éveillées par un système de brassard (Visitech Systems, BP-2000 series II, Apex, NC, USA) selon la même technique sphygmomanométrique utilisée pour mesurer la PAS chez les humains. Les pressions ont été mesurées sur une période de 3 jours consécutifs précédée d'une période d'acclimatation de 7 jours au système de mesure. Pour chaque série de mesures, la PAS a été mesurée à 15 reprises, avec uniquement les 10 dernières mesures enregistrées. Pour l'analyse statistique finale, la moyenne des 3 jours de mesures pour chaque souris a été utilisée.

4.9. Analyses plasmatiques

Le taux de cholestérol plasmatique total, de lipoprotéine de haute densité (HDL)-cholestérol sanguin, de LDL-cholestérol et de triglycérides a été déterminé par mesures photométriques en utilisant l'analyseur Cobas C111 (Roche Diagnosis). Ces analyses ont été réalisées à la plateforme « Mouse Metabolic Facility (MEF) » de l'UNIL.

4.10. Analyses statistiques

Les résultats de la capacité de marche et de la perfusion ont été analysés par une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs (facteur temps et facteur traitements) avec mesures répétées, suivie de tests de comparaisons multiples (Tukey).

Pour l'analyse des résultats physiologiques, de la cytométrie de flux, une ANOVA à un facteur avec mesures répétées a été utilisée, suivie de tests de comparaisons multiples (Tukey).

Les différents résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type (SD). Les résultats pour lesquels la valeur p est < 0.05 ont été considérés comme statistiquement significatifs. Toutes les analyses statistiques ainsi que les histogrammes ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism, version 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

5. Résultats

Les résultats du groupe traitement combiné (EX+ATO+TEL) que j'ai expérimenté et qui sont ici présentés ont été directement comparés aux résultats des groupes CON, EX, ATO et TEL issus d'un précédent travail (Mme Diane Macabrey ; master of Science in Medical Biology, faculté de biologie et de médecine, UNIL, janvier 2018).

5.1. Effet de la combinaison des traitements sur les paramètres physiologiques chez notre modèle murin d'AOMI.

	CON	EX	ATO	TEL	EX+ATO+TEL
Cholestérol total (mmol/L)	9.9 ± 0.9	10.1±1.3	13.5±1.3	11.8±0.8	18.1±4.3 [°]
HDL-cholestérol (mmol/L)	2.4±0.1	2.1±0.2	2.4±0.1	2.6±0.2	3.8±1.6 ^α
LDL-cholestérol (mmol/L)	5.2±0.7	4.8±0.1	8.9±1.2	6.6±0.3	14.0±5.3 [°]
Triglycéride (mmol/L)	2.0±0.3	2.1±0.4	1.5±0.2	2.2±0.4	1.6±0.5
PAS (mmHg)	104±9	106±7	105±6	75±5 [#]	71±7 [#]
Poids corporel (grammes)	29.5±1.3	31.0±0.6	31.2±0.9	30.8±0.5	30.0±2.0 ^ω

Tableau 4 : Profil lipidique, PAS et poids corporel à la fin de l'étude pour chaque groupe expérimental.

Les données sont présentées en moyenne+SD avec n=6 souris dans le groupe CON, n=4 souris dans le groupe EX, n=5 souris dans le groupe ATO, n=5 souris dans le groupe TEL et n=5 souris dans le groupe EX+ATO+TEL.

[°] p<0.05 vs CON, EX, ATO et TEL

^α p<0.05 vs EX

[#] p<0.05 vs CON, EX et ATO

^ω p<0.05 vs ATO

Résultats précédemment obtenus (groupes CON, EX, ATO et TEL) :

Les taux de cholestérol total, de HDL-cholestérol, de LDL-cholestérol et de triglycérides ne sont pas significativement différents entre les 4 groupes. La PAS est significativement diminuée chez le groupe TEL comparativement aux groupes CON, EX et ATO (p<0.05). Il n'y a pas de différence significative au niveau du poids corporel entre les 4 groupes.

Nouveaux résultats (combinaison des traitements) :

Le taux de cholestérol total est significativement plus élevé dans le groupe EX+ATO+TEL par rapport aux autres groupes de souris (+83% vs. CON, +79% vs. EX, +34% vs. ATO, +53% vs. TEL ; p<0.05). Ce résultat est associé à une augmentation significative du taux de LDL-cholestérol (+169% vs. CON, +191% vs. EX, +57% vs. ATO, +112% vs. TEL ; p<0.05). Le taux de HDL-cholestérol est également augmenté de manière significative dans le groupe EX+ATO+TEL par rapport au groupe EX (+81%, p<0.05), et tend à augmenter comparativement aux groupes CON (+58%, p=0.058) et ATO (+58%, p=0.057). La PAS est diminuée de manière significative dans le groupe EX+ATO+TEL par rapport aux groupes CON (-32%), EX (-33%) et ATO (-32%) (p<0.0001). La PAS du groupe EX+ATO+TEL est comparable à celle du groupe TEL.

Le poids corporel des souris du groupe EX+ATO+TEL est significativement diminuée (-4%) par rapport au groupe ATO (p<0.05).

5.2. Effet de la combinaison des traitements sur la capacité de marche chez notre modèle murin d'AOMI.

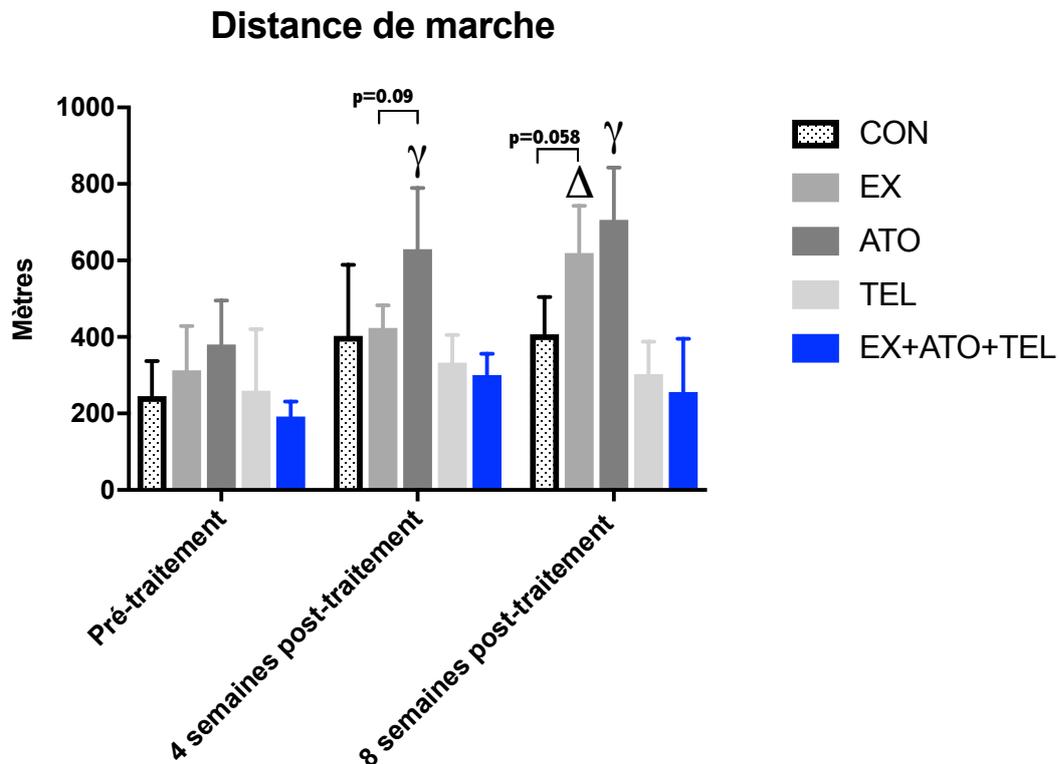


Figure 8: Comparaison de la MWDTE entre les 5 groupes expérimentaux.

La distance maximale de marche jusqu'à épuisement a été mesurée par un test incrémental sur tapis roulant avant le commencement des traitements, après 4 semaines de traitement et après 8 semaines de traitement comme décrit dans **Matériel et méthodes**.

Les données sont présentées en moyenne \pm SD avec n=6 dans le groupe CON, n=4 dans le groupe EX, n=5 dans le groupe ATO, n=5 dans le groupe TEL et n=5 dans le groupe EX+ATO+TEL.

γ : $p < 0.05$ versus CON, TEL et EX+ATO+TEL

Δ : $p < 0.01$ versus TEL et EX+ATO+TEL

Résultats précédemment obtenus (groupes CON, EX, ATO et TEL) :

Après 4 semaines de traitement, la MWDTE est significativement augmentée dans le groupe ATO comparativement aux groupes CON et TEL ($p < 0.05$), et tend à être augmentée par rapport au groupe EX ($p = 0.09$).

Après 8 semaines de traitement, la MWDTE du groupe ATO est toujours significativement plus élevée que celles des groupes CON et TEL ($p < 0.05$). La MWD est aussi augmentée chez le groupe EX ($p = 0.058$ vs. CON et $p < 0.01$ vs. TEL après 8 semaines de traitement).

Nouveaux résultats (combinaison des traitements) :

La MWDTE n'a pas été significativement améliorée chez le groupe EX+ATO+TEL comparativement aux 4 autres groupes que ce soit après 4 semaines ou 8 semaines de traitement.

5.3. Effet de la combinaison des traitements sur la perfusion périphérique chez notre modèle murin d'AOMI.

Perfusion de la patte ischémique

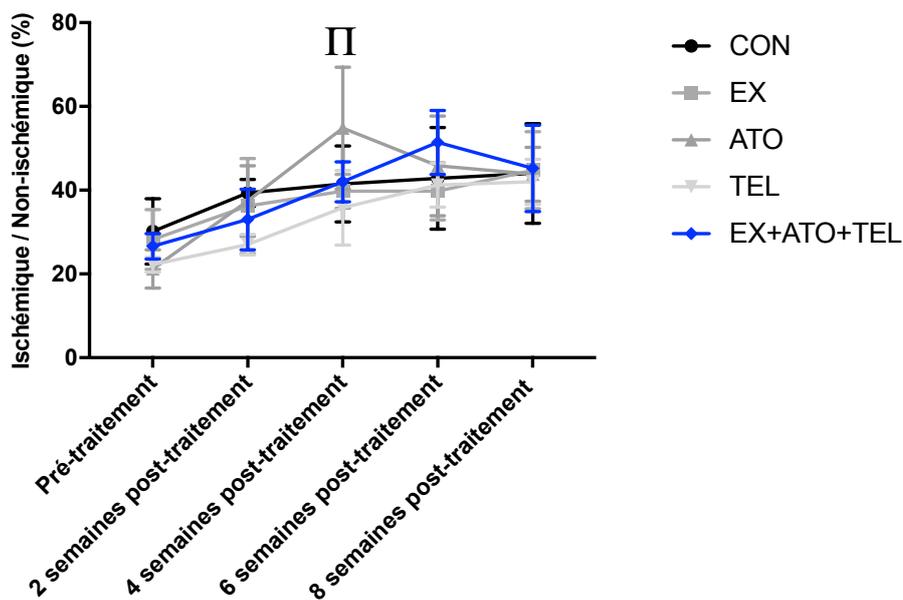


Figure 9 : Comparaison de la perfusion de la patte ischémique entre les 5 groupes expérimentaux.

Analyse quantitative de la perfusion de la patte ligaturée (ischémique) exprimée en pourcentage de la perfusion de la patte non ligaturée (non-ischémique) avant le commencement des traitements et aux semaines 2, 4, 6 et 8 post-traitement. La perfusion a été mesurée par imagerie laser Doppler comme décrit dans **Matériel et méthodes**. Les données sont présentées en moyenne \pm SD avec n=6 dans le groupe CON, n=4 dans le groupe EX, n=5 dans le groupe ATO, n=5 dans le groupe TEL et n=5 dans le groupe EX+ATO+TEL.

Π p<0.05 vs EX et TEL

Résultats précédemment obtenus (groupes CON, EX, ATO et TEL) :

Après 4 semaines de traitement, le flux cutané de la patte ischémique est significativement améliorée dans le groupe ATO (p=0.064 vs. CON, p<0.05 vs. EX et TEL). Après 8 semaines de traitement, la perfusion n'est plus significativement améliorée chez le groupe ATO.

Nouveaux résultats (combinaison des traitements) :

Le flux cutané de la patte ischémique n'a pas été significativement amélioré chez le groupe EX+ATOR+TEL ni après 4 semaines, ni après 8 semaines de traitement.

5.4. Effet de la combinaison des traitements sur le phénotype des monocytes chez notre modèle murin d'AOMI au niveau systémique.

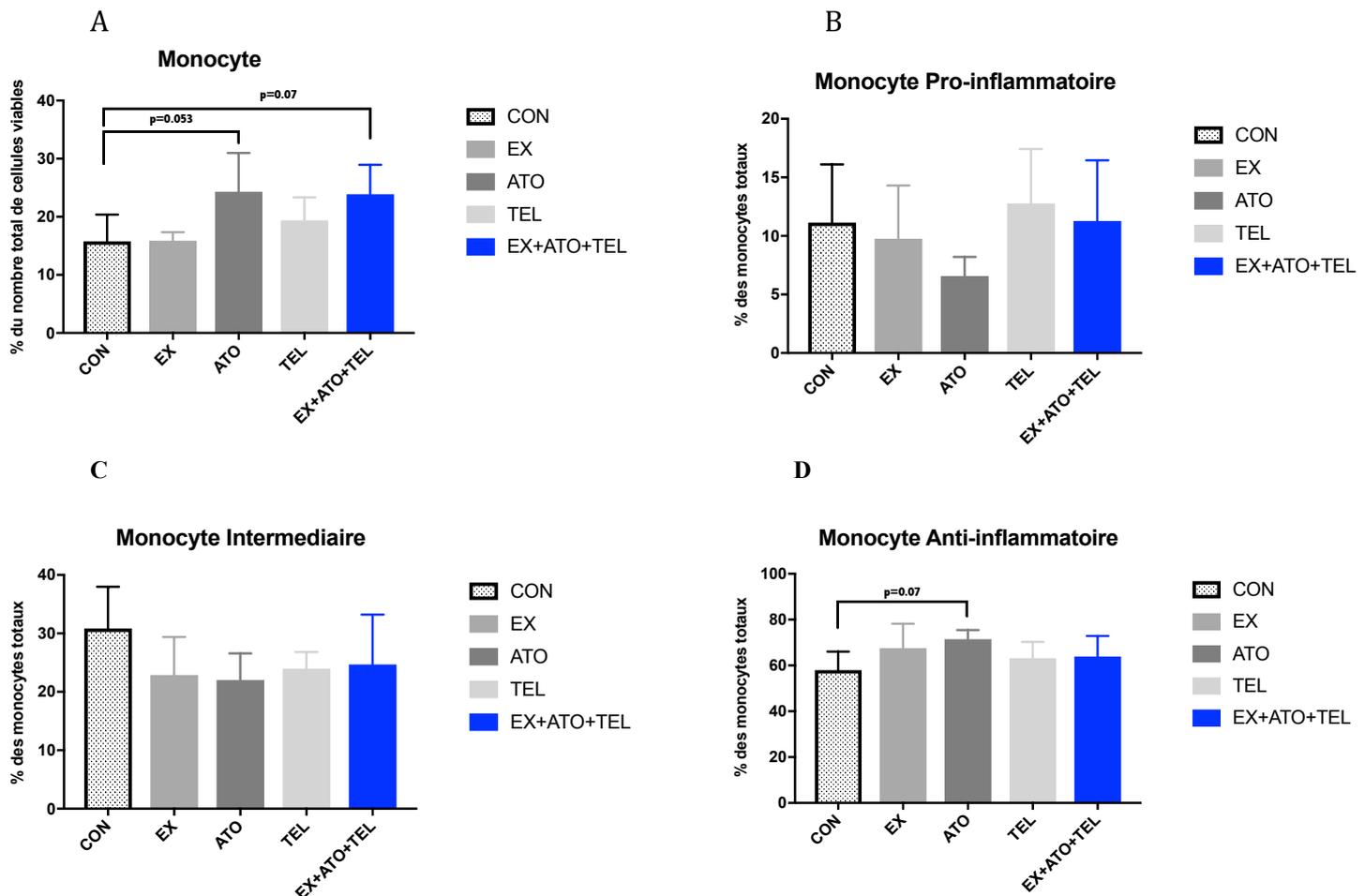


Figure 10: Comparaison des différentes sous-populations de monocytes présentes dans la rate entre les 5 groupes expérimentaux.

Quantification des monocytes (CD11b+ Ly6G-) exprimée en % de cellules viables (A). Quantification des monocytes pro-inflammatoires (CD11b+ Ly6G^{high} Ly6C^{high}) (B), monocytes intermédiaires (CD11b+ Ly6G^{medium} Ly6C^{medium}) (C) et monocytes anti-inflammatoires (CD11b+ Ly6G^{low} Ly6C^{low}) (D) exprimés en % de monocytes.

Les analyses des différentes populations monocytaires ont été effectuées par cytométrie de flux comme décrit dans **Matériel et méthodes**. Les données sont présentées en moyenne±SD avec n=6 dans le groupe CON, n=4 dans le groupe EX, n=5 dans le groupe ATO, n=5 dans le groupe TEL et n=5 dans le groupe EX+ATO+TEL.

Résultats précédemment obtenus (groupes CON, EX, ATO et TEL) :

Dans le groupe ATO, on observe une tendance à l'augmentation du nombre de monocytes total ($p=0.053$) et de monocytes anti-inflammatoires ($p=0.073$) par rapport au groupe CON.

Le nombre de monocytes pro-inflammatoires et de monocytes intermédiaires n'est pas significativement différent entre les 4 groupes.

Nouveaux résultats (combinaison des traitements) :

Le nombre de monocytes total tend à augmenter dans le groupe EX+ATO+TEL par rapport au groupe CON (+51%; $p=0.07$).

Ni le nombre de monocytes pro-inflammatoires, ni le nombre de monocytes intermédiaires, ni celui de monocytes anti-inflammatoires ne sont significativement modulés dans le groupe EX+ATO+TEL comparé aux autres groupes.

5.5. Effet de la combinaison des traitements sur le phénotype des lymphocytes T chez notre modèle murin d'AOMI au niveau systémique.

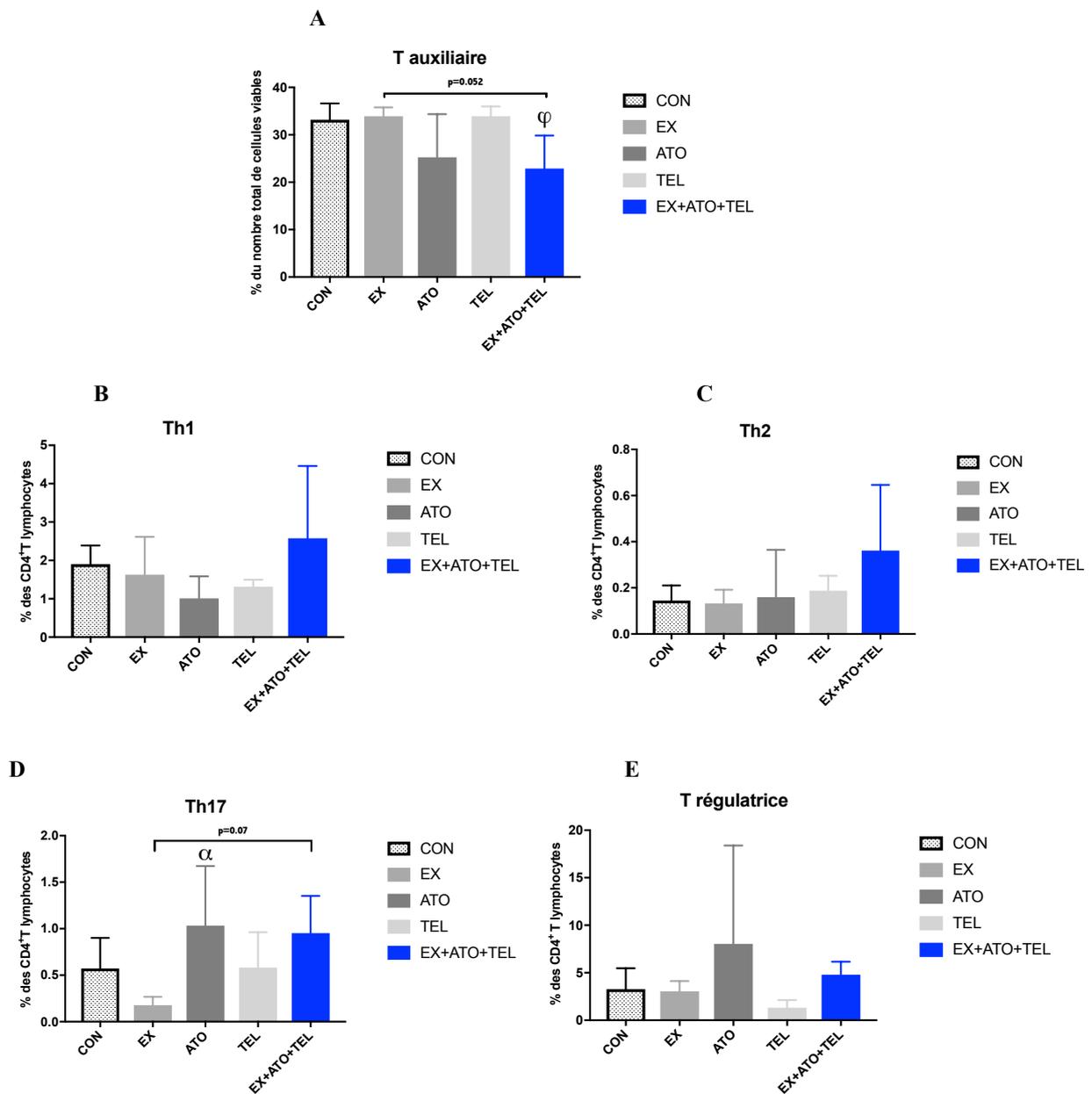


Figure 11: Comparaison des différentes sous-populations de lymphocytes T présentes dans la rate entre les 5 groupes expérimentaux.

Quantification des lymphocytes T (CD4⁺) exprimée en % de cellules viables (A). Quantification des lymphocytes Th1 (CD4⁺IFN γ ⁺) (B), lymphocytes Th2 (CD4⁺IL4⁺) (C) lymphocytes Th17 (CD4⁺IL17⁺) (D), et lymphocytes T reg (CD4⁺FOXP3⁺) (E) exprimés en % de lymphocytes T.

Les analyses des différentes populations lymphocytaires ont été effectuées par cytométrie de flux comme décrit dans **Matériel et méthodes**). Les données sont présentées en moyenne \pm SD avec n=6 dans le groupe CON, n=4 dans le groupe EX, n=5 dans le groupe ATO, n=5 dans le groupe TEL et n=5 dans le groupe EX+ATO+TEL.

α p<0.05 vs EX

Résultats précédemment obtenus (groupes CON, EX, ATO et TEL) :

Le nombre de lymphocytes T auxiliaires, de Th1, de Th2 et de T regs n'est pas significativement différent entre les 4 groupes.

Le nombre de lymphocyte Th17 est significativement plus élevé dans le groupes ATO que dans le groupe EX ($p < 0.05$).

Nouveaux résultats (combinaison des traitements) :

Le nombre de lymphocytes T auxiliaires est diminué dans le groupe EX+ATO+TEL par rapport aux groupes CON (-31% ; $p < 0.05$), TEL (-33% ; $p < 0.05$) et EX (-33% ; $p = 0.052$). Le nombre de lymphocyte Th17 tend à augmenter (+350% ; $p = 0.07$) par rapport au groupe EX.

Le nombre de Th1, Th2 et T reg n'est pas significativement différent dans le groupe EX+ATO+TEL par rapport aux autres groupes.

6. Discussion

L'objectif de ce travail a été d'investiguer l'effet de la combinaison de l'EX structuré sur tapis de course, de l'ATO et du TEL sur la capacité de marche, la perfusion microcirculatoire périphérique et le phénotype des lymphocytes T et monocytes au niveau systémique chez un modèle murin d'AOMI et de CI.

Les résultats principaux de notre étude sont que la combinaison des traitements n'a d'effet significatif ni sur la capacité de marche, ni sur la perfusion microcirculatoire périphérique, ni sur le phénotype des lymphocytes T et monocytes.

Comme cela a été reporté chez le patient avec AOMI (8,21,22), nos données préalables (master of Science in Medical Biology, Mme Diane Macabrey, faculté de biologie et de médecine, UNIL, janvier 2018) montrent que l'EX seul ainsi que l'ATO seul améliorent la capacité de marche chez notre modèle murin d'AOMI et de CI. Le TEL seul n'a quant à lui pas eu d'effet positif sur la capacité de marche, contrairement aux études chez le patient AOMI où quelques évidences scientifiques ont montré un bénéfice comme discuté dans l'introduction de ce travail (14). Sur la base de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la combinaison de ces traitements pourrait améliorer la capacité de marche de façon additive voir synergique en comparaison aux traitements seuls.

Contrairement à notre hypothèse, le traitement combiné n'a eu ni un effet additionnel, ni un effet synergique sur l'amélioration de la capacité de marche. Dans la littérature scientifique, aucune étude n'a, à notre connaissance, investigué l'effet thérapeutique du traitement combinant EX, ATO et TEL dans une pathologie telle qu'elle soit, que ce soit chez l'homme ou le modèle animal. Quelques rares études ont toutefois investigué l'effet thérapeutique d'un traitement combinant soit EX et ATO, soit TEL et ATO dans l'ATS expérimentale. Par exemple, Moustardas et al. (2014) ont montré, chez des souris ApoE^{-/-} sous un régime riche en graisse, que la combinaison d'ATO (10 mg/kg/jour) et d'un EX sur tapis roulant pendant 4 mois n'a pas eu d'effet additif ou synergique par rapport à l'effet des deux traitements seuls sur la diminution et la stabilisation des lésions athéromateuses (23). De même, toujours chez le même modèle animal, Grothusen et al. (2005) ont montré que la combinaison de TEL (1 mg/kg/jour) et ATO (1 mg/kg/jour) durant 3 mois n'a pas été bénéfique sur la progression et la stabilisation des plaques d'ATS par rapport aux traitements seuls (24). Ces deux études suggèrent donc que le bénéfice thérapeutique n'est pas supérieur avec la combinaison de 2 traitements en comparaison aux traitements seuls pour prévenir le développement ou la progression des plaques d'ATS. Ainsi, sur la base de ces études, il n'est pas étonnant que notre traitement combiné n'a pas eu d'effet additionnel sur la capacité de marche et la perfusion du membre inférieur ischémique chez notre modèle d'AOMI. Si aucun

effet additionnel n'a pu être mise en évidence, il est toutefois surprenant et inattendu que la combinaison des traitements n'a pas amélioré la capacité de marche alors que l'EX et de l'ATO seuls sont bénéfiques. Il semblerait donc que le TEL ait annulé l'effet bénéfique de l'EX et de l'ATO sur la capacité de marche. Ce résultat pourrait peut-être s'expliquer par la dose de TEL (20 mg/jour/Kg) que nous avons choisi dans notre travail et qui a provoqué une importante diminution de la PAS (>30 mmHg soit une réduction de 32%), qui est toutefois conforme à l'étude de Schlimmer et al. (2011) sur laquelle nous nous sommes basés pour le choix de la dose qui a observé une baisse de PAS de 26mmHg après 8 semaines de traitement également chez des souris ApoE^{-/-} (25). Si nous n'avons pas trouvé dans la littérature les valeurs de PAS qui définissent une hypotension chez la souris, nous émettons l'hypothèse que nos souris traitées avec le TEL avaient une PAS trop basse qui pourrait être une des causes des mauvaises performances au test d'effort sur tapis roulant. Pour appuyer notre hypothèse, et malgré les limites de la transposition des résultats du modèle animal à l'homme et réciproquement, l'étude de Zankl et al (2010) ont montré une amélioration de la capacité de marche chez des patients AOMI sous TEL (40 mg/jour) où la diminution de la PAS observé était « uniquement » de 10% (de 150 mmHg à 135 mmHg) (14).

De manière surprenante, notre étude montre que la combinaison des traitements a mené à une augmentation significative du cholestérol total et du LDL-cholestérol sanguin alors que l'EX, l'ATO et le TEL seuls n'ont pas eu d'effet significatif sur le profil lipidique de nos souris. Il est important de noter que, même si les effets ne sont pas significatifs, l'ATO seul a augmenté respectivement de 36% et 71% les taux de cholestérol total et LDL-cholestérol, et le TEL de 19% et 27%. Il semblerait donc que la combinaison de l'ATO et du TEL a eu un effet synergique sur les taux de cholestérol total et du LDL-cholestérol chez notre modèle murin. Cette augmentation du taux de cholestérol total et de LDL-cholestérol en réponse à un traitement combinant ATO et TEL a déjà été reporté dans l'étude de Grothusen et al. (2005) préalablement cité. Une explication à ce résultat serait que le traitement par statine, spécifiquement chez la souris ApoE^{-/-}, augmenterait l'activité de l'HMG-CoA-réductase endogène, avec pour conséquence une augmentation de la production de cholestérol. De plus, le TEL pourrait agir comme un agoniste des récepteurs activés par les proliférateurs des peroxyosomes (PPAR) ; or il a été montré que les agonistes des PPARs induisent une augmentation du LDL-cholestérol chez la souris ApoE^{-/-} (24). D'un point de vue des mécanismes d'action, nous émettons donc l'hypothèse que la combinaison de l'ATO et du TEL a augmenté le taux de cholestérol et du LDL-cholestérol chez notre modèle par une action synergique sur l'activité de l'HMG-CoA et l'activation des PPARs gamma.

Nos données préalables ont révélé une augmentation du flux sanguin au niveau de la patte ischémique uniquement dans le groupe ATO après 4 semaines de traitements. Ce bénéfice est toutefois transitoire puisque la perfusion n'est plus améliorée après 8 semaines de traitement avec ATO. Il n'est donc pas surprenant que la combinaison des traitements n'a pas eu d'effet additionnel ou synergique sur le flux sanguin. Comme décrit dans l'introduction, différentes études (26–28) montrent qu'il n'y a pas de corrélation directe entre le niveau de perfusion dans les membres inférieurs et la capacité de marche chez les patients avec AOMI. Cette présente étude chez le modèle animal confirme ce résultat puisque les capacités de marche sont significativement améliorées avec EX et ATO seuls alors que la perfusion périphérique en réponse à ces traitements reste inchangée. Ainsi, d'autres mécanismes sont à l'origine de l'amélioration de la capacité de marche en réponse aux traitements, notamment l'inflammation comme explicité dans l'introduction de ce mémoire.

Dans ce travail, nous avons également exploré le phénotype des lymphocytes T et des

monocytes au niveau systémique. Le rationnel de cette investigation étant qu'il est aujourd'hui bien démontré que ces deux populations cellulaires jouent un rôle majeur dans la régénération musculaire en réponse à une ischémie (29). Plus précisément, les récentes données de la littérature montrent que les monocytes, qui se différencient en macrophages dans les tissus, présentent une grande plasticité et peuvent adopter différents phénotypes en fonction du microenvironnement, avec des effets opposés sur la régénération musculaire. De manière simplifiée, les monocytes peuvent se différencier soit en cellules avec un phénotype pro-inflammatoire (qui se différencieront en macrophage M1 dans les tissus), soit en cellules avec un phénotype anti-inflammatoire (qui se différencieront en macrophage M2). Le rôle spécifique et respectif des monocytes pro-inflammatoires/macrophages M1 et anti-inflammatoires/macrophages M2 dans la régénération musculaire en cas d'ischémie a récemment été reviewé (30). Brièvement, dans les premières heures qui suivent une « atteinte » musculaire, le processus de régénération musculaire débute par une infiltration de macrophages M1, sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) et l'interleukine-1 β (IL-1 β) qui stimulent la prolifération des myoblastes. Ces mêmes macrophages adoptent ensuite un phénotype anti-inflammatoire qui stimulent la différenciation et la fusion des myoblastes en myotubes via la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-4 et IL-10, ainsi que la croissance des nouvelles fibres musculaires via la sécrétion de facteurs de croissance comme le facteur de croissance transformant- β (TGF- β) et le facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF-1) (30,31). A ce jour, très peu d'études ont examiné si une approche thérapeutique médicamenteuse ou non médicamenteuse avait la capacité de moduler le phénotype des monocytes au niveau systémique. Par exemple, Ruffino et al. (2016) ont montré une augmentation de l'expression des marqueurs M2 et une diminution de l'expression de marqueurs M1 au niveau des monocytes isolés du sang périphérique de sujets femmes en bonne santé à la suite d'un entraînement de 8 semaines à intensité modérée (marche pendant 45min, 3 fois/semaine) (32). A notre connaissance, notre étude est la première à avoir investigué l'effet combiné de l'EX, l'ATO et le TEL sur le phénotype des monocytes au niveau systémique dans l'AOMI et à avoir montré un phénotype inchangé en réponse à ces traitements.

Si la fonction « régénératrice » des monocytes/macrophages est connue depuis longtemps, ce n'est que récemment que les lymphocytes, notamment les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺, cytotoxiques CD8⁺ et T reg ont été identifiés comme jouant aussi un rôle dans la réparation musculaire, comme décrit dans une récente revue de Deyhle et al. (2018). Ainsi, les cellules T interviennent dans la réparation musculaire de différentes manières, principalement en permettant l'infiltration des cellules immuno-inflammatoires vers le site de la lésion et par la régulation de l'activité proliférative des cellules myogéniques. En effet, les lymphocytes T permettraient aux myocytes de garder leur capacité de prolifération et leur activité myogénique en créant un microenvironnement favorable par la sécrétion d'une combinaison de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , TNF- α , IFN- γ) sécrétées par les Th1 dans la première phase du processus de régénération musculaire et anti-inflammatoires (IL-13 principalement) sécrétées par les Th2 dans la deuxième phase du processus). De leur côté, les T regs auraient un effet bénéfique sur la régénération musculaire via la sécrétion d'amphiréguline, un facteur de croissance (33).

A ce jour, il y a une évidence grandissante qui indique que l'EX et les statines modulent de manière favorable le phénotype des lymphocytes T CD4⁺ chez l'humain. En effet, Yakeu et al (2010) ont investigué chez des individus sédentaires les effets d'un EX de basse intensité durant 8 semaines (marche 10'000 pas/jour, 3 fois/semaine) sur l'expression leucocytaire des ARNm de l'IL-4 (marqueur des Th2) et de l'IL-6 (marqueur des Th1) ainsi que sur le niveau plasmatique des cytokines IL-6 et TNF- α (pro-inflammatoires) et IL-10 (anti-inflammatoire).

Après 4 semaines, le taux plasmatique de IL-6 a diminué tandis que le taux de l'IL-10 a augmenté. Après 8 semaines, ils ont observé une augmentation de l'expression des ARNm de l'IL-4 et une diminution des ARNm de IL-6. Ces résultats indiquent que l'EX favorise la polarisation des cellules T CD4⁺ vers un phénotype anti-inflammatoire de type Th2 (34).

D'autre part, tout comme l'EX, les statines auraient aussi la capacité de moduler le phénotype des T CD4⁺ (35). Par exemple, Rodriguez-Perea et al. ont démontré dans une étude publiée en 2015 que la lovastatine et l'atorvastatine augmentent la proportion de T regs circulants chez des adultes sains après 30 jours de traitement (36). Chez des patients ayant eu un infarctus du myocarde avec sus-décalage du segment ST, Zhang et al. (2011) ont montré une augmentation (i) de la proportion de T regs dans le sang, (ii) de l'expression des ARNm du Foxp3 (facteur de transcription T reg-spécifique) au niveau des cellules mononuclées du sang périphérique et (iii) de la concentration en TGF- β (cytokine T reg-spécifique). Les auteurs ont également démontré une diminution de la concentration plasmatique en IFN- γ dans le sang ce qui suggère que les statines favoriseraient la polarisation des CD4⁺ vers un phénotype T reg « régénérateur » et inhiberaient leur orientation vers un phénotype Th1 délétère (37). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'EX, l'ATO et leur combinaison pouvaient moduler la polarisation des cellules T CD4⁺ dans notre modèle murin .

Dans notre étude, nous montrons pour la première fois que le phénotype des lymphocytes T, (tout comme celui des monocytes) n'est pas impacté au niveau systémique par le traitement combiné EX, ATO et TEL dans un modèle murin d'AOMI. D'autres investigations sont toutefois nécessaires pour confirmer ou non ces résultats.

Pour conclure, notre travail préclinique montre qu'une thérapie combinant l'ExS, l'atorvastatine et le telmisrtan n'apporte pas de bénéfice additionnel par rapport aux traitements seuls, ce qui suggère que ce traitement combiné n'est pas une option à privilégier pour le management de l'AOMI.

7. Perspective

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Premièrement, et afin de vérifier notre hypothèse selon laquelle la dose de TEL utilisée serait trop élevée (à l'origine d'une PAS trop basse qui pourrait être une des causes de la non-amélioration de la performance de marche chez les souris du groupe TEL et du groupe traitement combiné), il serait intéressant de répéter les expériences avec une dose plus faible de TEL. Une autre perspective intéressante serait aussi d'utiliser des souris hypertendues, non seulement pour être plus proche des caractéristiques cliniques des patients AOMI qui présentent dans la plupart du temps une hypertension, mais aussi pour voir si la dose de TEL utilisée aurait alors les mêmes effets. D'autre part, la dose d'ATO utilisée dans cette étude n'a pas abaissé les taux circulants de cholestérol total et LDL-cholestérol. Si cette dose nous a permis d'explorer les effets cholestérol-indépendants de l'ATO, il serait pertinent d'utiliser une dose qui fait baisser les lipides comme c'est le cas en clinique.

Il est aujourd'hui connu que les différentes classes de statines et de ARA-II ont des propriétés biologiques différentes (35). De ce fait, on pourrait répéter nos expériences avec d'autres types de statine et ARA-II afin de déterminer si il existe une statine ou un ARA-II qui serait le plus efficace pour le traitement de l'AOMI.

Enfin, dans notre étude, nous avons exploré le phénotype des cellules immuno-inflammatoires uniquement au niveau systémique. Une analyse au niveau tissulaire/musculaire serait pertinente et viendrait compléter les résultats obtenus au niveau systémique.

8. Bibliographie

1. Aboyans V, Ricco J-B, Bartelink M-LEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS) Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J* [Internet]. [cited 2017 Sep 19]; Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article/doi/10.1093/eurheartj/ehx095/4095038/2017-ESC-Guidelines-on-the-Diagnosis-and-Treatment>
2. Sfyri P, Matsakas A. Crossroads between peripheral atherosclerosis, western-type diet and skeletal muscle pathophysiology: emphasis on apolipoprotein E deficiency and peripheral arterial disease. *J Biomed Sci* [Internet]. 2017 Jul 8 [cited 2018 Jul 11];24. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5502081/>
3. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR, et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease. *Int Angiol J Int Union Angiol*. 2007 Jun;26(2):81–157.
4. Novo S. Classification, epidemiology, risk factors, and natural history of peripheral arterial disease. *Diabetes Obes Metab*. 2002 Mar;4 Suppl 2:S1-6.
5. A systematic review and meta-analysis of revascularization outcomes of infrainguinal chronic limb-threatening ischemia [Internet]. [cited 2018 Jul 11]. Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/31DAC63E5E80F72C89ED87FEBBBF7F003A9057FD B6320DB6F95E6AA74C3205E674AA182D0746B4637A890F1C60F17012>
6. Netgen. Dépistage de la maladie athéromateuse au cabinet du praticien : place de la mesure de la pression à la cheville [Internet]. *Revue Médicale Suisse*. [cited 2018 Jul 17]. Available from: <https://www.revmed.ch/RMS/2007/RMS-97/31992>
7. Gerhard-Herman MD, Gornik HL, Barrett C, Barshes NR, Corriere MA, Drachman DE, et al. 2016 AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease. *Circulation*. 2017 Mar 21;135(12):e726–79.
8. Lane R, Harwood A, Watson L, Leng GC. Exercise for intermittent claudication. In: *The Cochrane Library* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2017 [cited 2018 Jul 12]. Available from: <http://cochranelibrary-wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD000990.pub4/full>
9. Fakhry F, van de Luijngaarden KM, Bax L, den Hoed PT, Hunink MGM, Rouwet EV, et al. Supervised walking therapy in patients with intermittent claudication. *J Vasc Surg*. 2012 Oct 1;56(4):1132–42.
10. Mohler Emile R., Hiatt William R., Creager Mark A. Cholesterol Reduction With Atorvastatin Improves Walking Distance in Patients With Peripheral Arterial Disease. *Circulation*. 2003 Sep 23;108(12):1481–6.
11. Mondillo S, Ballo P, Barbati R, Guerrini F, Ammaturo T, Agricola E, et al. Effects of simvastatin on walking performance and symptoms of intermittent claudication in hypercholesterolemic patients with peripheral vascular disease. *Am J Med*. 2003 Apr 1;114(5):359–64.
12. Arao K, Yasu T, Endo Y, Funazaki T, Ota Y, Shimada K, et al. Effects of pitavastatin on walking capacity and CD34+/133+ cell number in patients with peripheral artery disease. *Heart Vessels*. 2017 Oct;32(10):1186–94.
13. Bagger JP, Helligsoe P, Randsbaek F, Kimose HH, Jensen BS. Effect of verapamil in

- intermittent claudication A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study after individual dose-response assessment. *Circulation*. 1997 Jan 21;95(2):411–4.
14. Zankl AR, Ivandic B, Andrassy M, Volz HC, Krumsdorf U, Blessing E, et al. Telmisartan improves absolute walking distance and endothelial function in patients with peripheral artery disease. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc*. 2010 Dec;99(12):787–94.
 15. Lotfi S, Patel AS, Mattock K, Egginton S, Smith A, Modarai B. Towards a more relevant hind limb model of muscle ischaemia. *Atherosclerosis*. 2013 Mar 1;227(1):1–8.
 16. Pellegrin M, Bouzourène K, Poitry-Yamate C, Mlynarik V, Feihl F, Aubert J-F, et al. Experimental peripheral arterial disease: new insights into muscle glucose uptake, macrophage, and T-cell polarization during early and late stages. *Physiol Rep*. 2014 Feb 1;2(2):e00234.
 17. Hafstad AD, Lund J, Hadler-Olsen E, Höper AC, Larsen TS, Aasum E. High- and Moderate-Intensity Training Normalizes Ventricular Function and Mechanoenergetics in Mice With Diet-Induced Obesity. *Diabetes*. 2013 Jul;62(7):2287–94.
 18. Garcia NF, Sponton AC, Delbin MA, Parente JM, Castro MM, Zanesco A, et al. Metabolic parameters and responsiveness of isolated iliac artery in LDLr^{-/-} mice: role of aerobic exercise training. *Am J Cardiovasc Dis*. 2017 Apr 15;7(2):64–71.
 19. Tiyerili V, Mueller CFH, Becher UM, Czech T, van Eickels M, Daiber A, et al. Stimulation of the AT2 receptor reduced atherogenesis in ApoE^{-/-}/AT1A^{-/-} double knock out mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Mar 1;52(3):630–7.
 20. Donners MMPC, Wolfs IMJ, Stöger LJ, van der Vorst EPC, Pöttgens CCH, Heymans S, et al. Hematopoietic miR155 deficiency enhances atherosclerosis and decreases plaque stability in hyperlipidemic mice. *PloS One*. 2012;7(4):e35877.
 21. Aung PP, Maxwell H, Jepson RG, Price J, Leng GC. Lipid-lowering for peripheral arterial disease of the lower limb. In: *The Cochrane Library* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2007 [cited 2018 Jul 11]. Available from: <http://cochranelibrary-wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD000123.pub2/full>
 22. Momsen AH, Jensen MB, Norager CB, Madsen MR, Vestersgaard-Andersen T, Lindholt JS. Drug therapy for improving walking distance in intermittent claudication: a systematic review and meta-analysis of robust randomised controlled studies. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg*. 2009 Oct;38(4):463–74.
 23. Moustardas P, Kadoglou NPE, Katsimpoulas M, Kapelouzou A, Kostomitsopoulos N, Karayannacos PE, et al. The Complementary Effects of Atorvastatin and Exercise Treatment on the Composition and Stability of the Atherosclerotic Plaques in ApoE Knockout Mice. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Sep 29 [cited 2018 Jul 13];9(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4180453/>
 24. Grothusen C, Bley S, Selle T, Luchtefeld M, Grote K, Tietge UJF, et al. Combined effects of HMG-CoA-reductase inhibition and renin–angiotensin system blockade on experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2005 Sep 1;182(1):57–69.
 25. Schlimmer N, Kratz M, Böhm M, Baumhäkel M. Telmisartan, ramipril and their combination improve endothelial function in different tissues in a murine model of cholesterol-induced atherosclerosis. *Br J Pharmacol*. 2011 Jun;163(4):804–14.
 26. Hamburg NM, Creager MA. Pathophysiology of Intermittent Claudication in Peripheral Artery Disease. *Circ J*. 2017;81(3):281–9.
 27. Anderson JD, Epstein FH, Meyer CH, Hagspiel KD, Wang H, Berr SS, et al. Multifactorial determinants of functional capacity in peripheral arterial disease: uncoupling of calf muscle perfusion and metabolism. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Aug 11;54(7):628–35.
 28. Szuba A, Oka RK, Harada R, Cooke JP. Limb hemodynamics are not predictive of functional capacity in patients with PAD. *Vasc Med Lond Engl*. 2006 Nov;11(3):155–63.

29. Zernecke A, Weber C. Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease. *Basic Res Cardiol*. 2005 Mar 1;100(2):93–101.
30. Théret M, Chazaud B, Mounier R. Quand un régulateur énergétique contrôle la résolution de l'inflammation - L'AMPK induit le changement de phénotype des macrophages au cours de la régénération musculaire. *médecine/sciences*. 2014 Jan 1;30(1):35–8.
31. Chazaud B. Macrophages: Supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology*. 2014 Mar 1;219(3):172–8.
32. Ruffino JS, Davies NA, Morris K, Ludgate M, Zhang L, Webb R, et al. Moderate-intensity exercise alters markers of alternative activation in circulating monocytes in females: a putative role for PPAR γ . *Eur J Appl Physiol*. 2016;116:1671–82.
33. Deyhle MR, Hyldahl RD. The Role of T Lymphocytes in Skeletal Muscle Repair From Traumatic and Contraction-Induced Injury. *Front Physiol* [Internet]. 2018 Jun 20 [cited 2018 Oct 1];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6019499/>
34. Yakeu G, Butcher L, Isa S, Webb R, Roberts AW, Thomas AW, et al. Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPAR γ and Th2 cytokines. *Atherosclerosis*. 2010 Oct;212(2):668–73.
35. Forero-Peña DA, Gutierrez FRS. Statins as modulators of regulatory T-cell biology. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:167086.
36. Rodríguez-Perea AL, Montoya CJ, Olek S, Chougnet CA, Velilla PA. Statins increase the frequency of circulating CD4+ FOXP3+ regulatory T cells in healthy individuals. *J Immunol Res*. 2015;2015:762506.
37. Zhang D, Wang S, Guan Y, Wang L, Xie W, Li N, et al. Effect of oral atorvastatin on CD4+CD25+ regulatory T cells, FoxP3 expression, and prognosis in patients with ST-segment elevated myocardial infarction before primary percutaneous coronary intervention. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011 May;57(5):536–41.