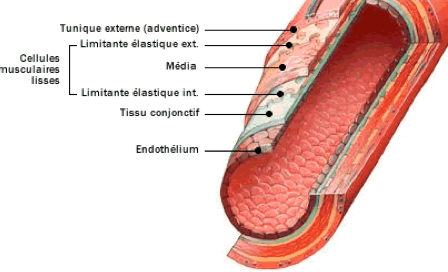
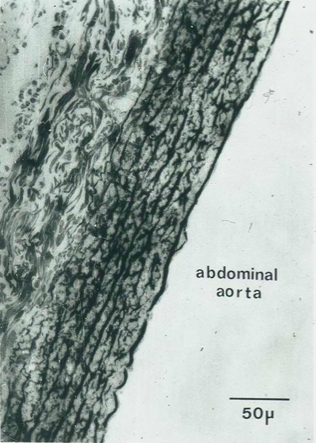
Mercredi 31 octobre

**Cours 4 : Méthodes d’étude en pathologie vasculaire**

1. **Structure de la paroi artérielle :**





Limitante élastique externe (LEE)

L’aorte est élastique car elle doit s’adapter à des pressions et des flux qui varient. Elle est donc composée de cellules musculaires lisses ensachées dans des lames élastiques.

Artère élastique = LE (limitante externe) + fibres de collagènes

Certaines artères sont très musculaires : artère rénale distale.

Endothélium = à la fois une interface et une barrière qui permet des échanges et protège aussi certains compartiments. Ils sont très différents en fonction de certaines régions du corps.

Exemple d’endothélium très imperméable : barrière hémato encéphalique (jonction très étanche entre les cellules, le contrôle est performant car les jonctions serrées sont très nombreuses au pôle apical de ces cellules endothéliales). Il n’y a que dans des situations très particulières où il peut y avoir des échanges en para cellulaire ou par transcytose. Par exemple, les cellules de types leucocytes peuvent pénétrer dans le parenchyme : établissement de jct avec les cellules endothéliales => diapédèse ex : foie, poumon, rein (endothélium très fenêstré, pas de continuité endothéliale). Tous les organes qui nécessitent un échange ont des endothéliums plus ou moins imperméables.

La lame basale est essentiellement composée de collagène 4 et glycoprotéines.

Sur l’aorte ouverte de murin (= préparation en face) : on voit le départ des intercostales (diapo 8).

On évalue ainsi l’intégrité de l’endothélium essentiellement chez le murin car il est transparent alors que chez l’homme c’est trop épais pour observer au microscope.

Ici, fixation in situ dans l’animal qui est euthanasié avec du formol par exemple (crée pontages entre les protéines) puis coloration (nitrate d’argent qui colore entre les cellules et l’hematoxyline qui colore les noyaux).

**2) Méthode d’étude :**

Microscopie : Inclusion dans la paraffine qui permet de durcir le tissu suffisamment pour le couper entre 3 et 6 microns. Si on fait une coupe fine, il y a inclusion dans la résine et coupe à l’ultra microtome (100 nanomètres).

L’avantage de la paraffine : résultat beaucoup plus précis que la congélation (en extemporanée)

En ME on ne peut pas faire de vues globales (très zoomé, permet de visualiser les structures intracellulaires).

Le bleu de toluidine permet de visualiser les lames élastiques.

**3) L’athérosclérose**est une maladie à développement intimal (espace sous endothélial)

Il s’agit de phagocytes qui captent de manière contrôlée des lipides puis vont s’accumuler dans l’espace intimal, il y a néanmoins maintien de l’endothélium.

Vient du grec : athéré = bouillie (corps necrotico lipidique) et sclérose = dure (calcifications)

Certains auteurs disent que les cellules musc lisses sont aussi capables de phagocyter le LDL.

Les cellules spumeuses (ressemblent à de la mousse) sont des macrophages= foam cell

L’athérosclérose débute souvent par dysfonction endothéliale, ou lésion de l’endothélium.

Cette maladie se développe surtout aux zones de bifurcation et de turbulences, la ou l’endothélium va subir des différences de flux ce qui l’active c’est à dire qu’il exprime des molécules d’adhésion pour les leucocytes et favorise l’accumulation de cellules circulantes dans le sous endothélium. Le monocyte se différencie en macrophage dans le tissu. Donc les macrophages présents dans le tissu, possédant des molécules d’adhésions, favorisent la captation de LDL.

Plus il y a de cholestérol circulant, plus il y a de chance qu’il s’accumule en intima des vaisseaux. Il existe des mutants chez l’humain qui favorise l’accumulation de cholestérol : hypercholestérolémie familiale = soit les patients sont déficients pour le récepteur au LDL. Ou alors, il n’est pas fonctionnel donc le LDL n’est pas capté par les cellules qui en ont besoin. Ainsi, le taux circulant augmente et favorise son dépôt dans l’intima.

Les LDL une fois dans l’intima sont modifiées : elles sont oxydées et ne sont plus captées par les récepteurs au LDL. Elles sont captées par des récepteurs scalenger (éboueurs) donc même si les macrophages n’ont pas les récepteurs au LDL ils ont d’autres types de récepteurs qui font qu’ils vont se gaver de LDL quand même.

Donc : endothélium activé par exemple par une lésion mécanique => accumulation de leucocytes au niveau de la lésion. Les molécules d’adhésions (ICAM, NCAM) exprimées, vont permettre aux leucocytes de ralentir (= rolling), puis s’arrêtent et peuvent faire une diapédèse. Il y aussi une activation des plaquettes car l’endothélium est absent donc il y a exposition des fibres de collagènes.

Chez l’homme les leucocytes majoritaires sont les neutrophiles or chez la souris ce sont les lymphocytes. On étudie l’athérosclérose sur la souris mais elle a autour de 80% de lymphocytes alors que c’est l’inverse chez l’Homme. Donc étudier l’athérosclérose chez la souris va probablement mettre en évidence un rôle artéfactuel des lymphocytes puisque chez l’homme on en a moins. Mise en garde contre le modèle murin qui a une formule sanguine inversée et en plus de ça une formule lipidique également inversée c’est à dire qu’il vont transporter leur bon cholestérol par les LDL alors que chez les hommes c’est l’inverse.

Double biais de l’étude chez la souris.

L’autoradiographie : permet de marquer de manière radioactive certains phénomènes. La Thymidine tritiée différencie l’ADN de l’ARN car l’ADN en cours de réplication, intègre la thymidine (il s’agit d’un composant de l’ADN). Il faut bien que la cellule soit en réplication. C’est le cas lors de la réparation de l ‘endothélium.

**4) Les modèles animaux de l’athérosclérose :**

Les souris ont des taux de cholestérol faibles. De plus, il est surtout transporté par les HDL car ils n’ont pas de CETP (permet le passage du cholestérol du HDL vers les LDL donc renforce le pool de LDL). Le fait d’inhiber la CETP devrait augmenter le pool de HDL. On va faire monter le taux de bon cholestérol en inhibant le CETP. Echec en pratique = ça tue les gens. Donc d’autres inhibiteurs en cours de test.

Traitement actuel : les statines, agissent directement au niveau de la synthèse de cholestérol. Ça diminue très bien le taux de cholestérol.

Les chercheurs créent des délétions du gène de l’apoE (exprimée par les LDL, IDL, chylomicrons) = KOApoE => ces souris ont un taux de LDL très augmenté car apoE est nécessaire à la recaptation des lipoprotéines et des chylomicrons par le foie et ça augmente donc indirectement le pool de LDL. Ces souries développent des plaques d’athéromes donc on les utilise comme modèle animal. On utilise aussi des souris avec délétions du gène du récepteur aux LDL

Les lapins ont cette déficience du récepteur au LDL donc modèle correct mais ne vont pas vers des complications de l’athérosclérose très importantes ça se limite au stade de stries lipidiques.

Les primates et cochons : ça ressemble a notre athérosclérose mais modèles trop chers.

Rats et chiens sont très résistants à l’athérosclérose donc jamais utilisés et très difficile de faire des KO sur le rat.

5**) Techniques d’imageries pour étudier l’athérosclérose:**

Il y a des développements technologiques en cours soit en utilisant des agents de contraste spécifique ou non spécifique. Soit en changeant un peu les séquences d’acquisition IRM. (T2 étoile) : protons s’agitent de manière différente selon la séquence que l’on va acquérir et notamment on peut utiliser des sondes qui vont cibler des choses à l’intérieur de la plaque, on rajoute quelque chose qui fait que le signal change donc on peut cibler les phagocytes, les protéases, les LDLox… on peut utiliser par exemple des boulettes de fer (injection de SPIO = small particules of iron oxydes) et les phagocytes les mangent ce qui donne un signal en IRM comme on voit sur l’image de l’aorte thoracique de ces lapins (diapo 24). Mise en évidence d’une fonction : phagocyter les boulettes de fer.

Quand on fait l’analyse histologique de ce lapin à qui on un peu lésé l’endothélium et on a injecté les boulettes par IV : on voit que ce sont des phagocytes car ils ont mangé les billes de fer (colorées en bleu par le bleu de prusse). On observe que les cellules phagocytaires constituent le cœur necrotico lipidique, et les cellules musculaires lisses (marqueur = alpha actine) constituent la chape fibreuse.

Cette technique permet de corréler le résultat observé par l’IRM.

Scintigraphie : on peut coupler un certain nombre de molécules à du technetium ce qui permet de visualiser in vivo un certain nombre de choses. Ex : annexine 5 couplée au technetium car au sein de la plaque d’athérosclérose, on a plus d’apoptose qu’ailleurs. Effectivement, on a rehaussement du signal au niveau des plaques car apoptose donc captation d’annexine 5.

Apoptose = exposition des phosphatydyl serine détectées par l’annexine 5.

Ces techniques sont soit fondées sur les différences de structures visualisées par la technique, soit c’est vous qui allez injecter quelque chose qui va se lier à des éléments de la plaque et qui permettent de visualiser.

Pour visualiser l’activation de protéases on utilise la zimographie in situ. On utilise des substrats de protéases qui deviennent fluorescents lorsqu’il sont clivés par les protéases. (diapo 40). Afin de valider l’affinité de la protéase pour son substrat, on inhibe les metallo protéinases matricielles (=MMP, elles ont besoin de calcium ou de zinc pour fonctionner). Quand on inhibe les MMP => on a plus l’activité protéolytique donc c’était bien des MMP.

**6) Complications de l’athérosclérose chez l’homme**: l’anévrisme de l’aorte abdominale = dilatation, grave on peut en mourir.

On oppose le remodelage d’une sténose (constrictif) à un remodelage expansif (vers l’extérieur).

Au départ, il s’agit d’athérosclérose sur laquelle va se placer progressivement un thrombus. Cela entraîne une perte de parallélisme des bords de l’aorte, la media disparaît quasiment dans la zone anévrysmale. On a une perte de la fonction de contention de l’aorte due à une protéolyse progressive de la MEC et d’une disparition de la média. L’adventice essaie de prendre le relais, fibrose pour essayer de contenir le sang et lutter contre la force de convection de la lumière vers l’extérieur de l’aorte.

Thrombus = riche en Hb, en leucocytes, il y a probablement des agents qui favorisent leur recrutement. Normalement, cicatrisation du thrombus grâce à des fibroblastes qui recolonisent le trombus etc.… Dans l’aorte, il n’y a pas de cicatrisation car activité oxydante et protéolytique trop importantes.

Hypothèse  sur la non cicatrisation du thrombus au niveau de l’aorte: bactérie de la bouche passent dans la circulation, s’accrochent sur le thrombus et recrutent des leucocytes qui dégranulent.

Il existe d’autres anévrysmes (ex sur l’aorte thoracique) qui ne sont pas du tout dus à l’athérosclérose. Part génétique très importante => défaut de synthèse d’élastine, syndrome de Marfan. Modèle d’anévrysme utilisé : injection d’elastase dans l’aorte.

Resténose = cellules musculaires lisses qui repoussent par dessus le ressort. Pour prévenir ça on a crée des stents actifs (recouvert d’une matière qui va inhiber la prolifération des cellules).