

TH/M101

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale

Interdisciplinaire Sciences-Santé

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 24 Mars 2010 par

Mohamed El Amine BESSAAD



**Détection et suivi en IRM du macrophage polarisé
et marqué aux nanoparticules de fer dans
l'athérosclérose et l'imagerie de l'inflammation.**

JURY :

Pr. André Briguet
Dr. Monique Bernard
Pr. Nicolas Grenier
Dr. Didier Letourneur
Dr. Zouher El Majd
Pr. Norbert Nighoghossian
Dr. Serge Nataf
Pr. Emmanuelle Canet-Soulas

Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Table des matières



REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES.....	5
TABLE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX.....	11
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION GENERALE	15
CHAPITRE I	18
I. L'Athérosclérose, une maladie inflammatoire :	19
II. Rôle des monocytes et macrophages dans l'athérosclérose	26
II.1. le Macrophage (MΦ)	26
II.2. Polarisations M1 et M2 :	29
II.3. Les acteurs de l'inflammation dans l'athérosclérose :	32
II.3.1. Recrutement des monocytes/macrophages :	32
II.3.2. Les macrophages dans la plaque et leur polarisation :	33
II.3.3. Cellules dendritiques et lymphocytes dans la plaque :	35
II.3.4. Les cellules musculaires lisses (SMCs) dans la plaque :	36
II.3.5. Les cellules NK (Natural Killers) dans la plaque :	37
II.3.6. Les neutrophiles dans la plaque :	37
II.3.7. Les cellules mastocytaires et les lymphocytes B dans la plaque :	38
II.3.8. Les Plaquettes et les cellules endothéliales :	39
II.3.9. Les cytokines pro-inflammatoires dans la plaque :	39
III. Modèles animaux pour étudier la plaque d'athérome :	44
III.1. Le modèle murin dans l'athérosclérose :	45
III.1.1. Les souris ApoE KO :	46
III.1.2. Les souris ApoE KI :	47
III.2. Le modèle d'inflammation au LPS	48
IV. Agents de contraste et Marquage cellulaire :	49
IV.1. Marquage cellulaire <i>in situ</i> :	50
IV.2. Marquage cellulaire <i>in vitro</i> :	51
IV.2.1. Marquages des MΦ péritonéaux.....	51
IV.2.2. Marquages des MΦ issus de la culture de cellules progénitrices de la moelle osseuse.....	52
IV.2.3. Avantages et limites	52
V. Les méthodes d'imagerie du macrophage	53
V.1. L'IRM	53
V.2. Imagerie de l'inflammation et des macrophages	54
V.3. Les autres techniques d'imagerie.....	56

CHAPITRE II	66
ACTIVATED MACROPHAGES MIGRATION, A MARKER OF AORTIC ATHEROMA PROGRESSION: A PRECLINICAL MRI STUDY IN MICE	66
RESUME	67
ARTICLE1	69
CHAPITRE III	91
LONGITUDINAL MRI FOLLOW-UP OF ANTI-INFLAMMATORY TREATMENT USING LABELLED M1-ACTIVATED MACROPHAGES	91
RESUME	92
ARTICLE 2	94
CHAPITRE IV	106
INFLAMMATION MRI IN RATS AFTER LPS CHALLENGE: EARLY DETECTION OF LABELLED M1-ACTIVATED MACROPHAGES	106
RESUME	107
ARTICLE 3	109
DISCUSSION GENERALE :	123
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	129
ANNEXES :	131

Résumé : L'athérosclérose est une maladie inflammatoire, caractérisée par une accumulation lipidique et cellulaire, dont le macrophage est l'acteur principal. Dans l'athérosclérose, le macrophage sécrète des cytokines qui favorisent le chimiotactisme et donc la migration et l'internalisation des cellules immunitaires, accentuant le processus pro-inflammatoire et accélérant l'évolution des plaques athéromateuses et leur instabilité jusqu'à éventuellement la rupture et/ou la formation de thrombus. Il est donc important de développer une technique d'imagerie cellulaire permettant de visualiser les macrophages et leur migration dans divers contextes pathologiques pour mieux comprendre leur implication, permettre le suivi thérapeutique et probablement leur utilisation dans la thérapie vectorisée. Le but de ce travail vise principalement à marquer aux nanoparticules de fer des macrophages activés de manière classiques (macrophages dits « M1 ») pour l'évaluation du statut inflammatoire dans un premier temps au sein des plaques d'athérome, et la visualisation de la dynamique de leur recrutement par IRM. Dans un deuxième temps, la méthode est exploitée pour montrer *in vivo* l'effet d'un traitement permettant de diminuer l'inflammation dans la plaque chez des souris invalidées pour le gène de l'apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}). Enfin, l'utilisation du protocole de marquage des macrophages M1 et leur suivi par IRM sont appliqués au diagnostic par imagerie d'une inflammation transitoire et circonscrite au poumon, induite par les lipopolysaccharides (LPS). En conclusion, le marquage des monocytes dirigés vers la voie M1 pour leur détection par IRM représente une méthode solide pour étudier différents phénomènes immunologiques en particulier le processus inflammatoire, et peut être un outil ou une approche de vectorisation permettant le suivi thérapeutique, cellulaire ou génique.

Title:

MRI Detection and tracking of M1 polarized macrophage labelled with iron nanoparticles for atherosclerosis and inflammation imaging.

Abstract: Atherosclerosis is an inflammatory disease characterized by vessel wall lipids and cells accumulation, for which the macrophage acts as a central actor. In atherosclerosis the macrophage secretes cytokines that promote chemotaxis and thus migration and internalization of immune cells. This phenomenon emphasizes pro-inflammatory processes and accelerates the development of atherosclerotic plaque instability to potentially its rupture with or without thrombus formation. It is therefore important to develop a technique for cell imaging to visualize macrophages and their migration in various pathological contexts to better understand their involvement, to allow therapeutic drug monitoring and probably their use in vectorized therapy. The aim of this work is mainly to label activated macrophages in classical way (macrophages called "M1") by iron nanoparticles, first to evaluate the inflammatory status within atherosclerotic plaques, and visualize their dynamic recruitment by MRI. In a second step, the method is used to show *in vivo* the effect of a treatment to reduce inflammation in the plaque, in mice invalidated for the gene for apolipoprotein E (ApoE^{-/-}). Finally, the protocol for M1 macrophages labelling and MRI tracking, was used for diagnostic imaging of a transient inflammation confined to the lung induced by lipopolysaccharide (LPS). In conclusion, the labelling of monocytes headed towards M1 polarization for their detection by MRI is a robust method to study various immunological phenomena in particular the inflammatory process, and can be an approach to vectorization and monitoring for gene or cell therapy.

DISCIPLINE : Génie Biologique et Médical

MOTS-CLES :

Inflammation, Macrophage, Athérosclérose, IRM, marquage cellulaire, Activation pro-inflammatoire, cytokines, nanoparticules, Apo-lipoprotéine E.

Université Claude Bernard Lyon I, Laboratoire CREATIS-LRMN, UMR 5220 CNRS, U630 INSERM, ESCPE, Domaine scientifique de la Doua, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France

