

UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER

FACULTES DE MEDECINE

ANNEE 2013

2013 TOU3 1509

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

**MEDECINE SPECIALISEE CLINIQUE**

présentée et soutenue publiquement

par

Line CUINAT

Interne des Hôpitaux

Le 15 avril 2013

**Sténose carotidienne athéromateuse récemment symptomatique :  
à la recherche de marqueurs de l'inflammation et d'activation  
plaquettaire**

Directrice de Thèse : Dr MAUPAS-SCHWALM Françoise

**JURY**

Mr le Professeur Vincent LARRUE

Président

Mr le Professeur Jean FERRIERES

Assesseur

Mr le Professeur Pierre SIE

Assesseur

Mme le Docteur Françoise MAUPAS-SCHWALM

Assesseur

Mr le Docteur Alain VIGUIER

Suppléant

Mr le Professeur Bernard PAYRASTRE

Membre Invité





**TABLEAU du PERSONNEL HU  
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier  
au 1<sup>er</sup> septembre 2012**

**Professeurs honoraires**

Doyen Honoraire	M. LAZORTHES G.	Professeur Honoraire	M. PONTONNIER
Doyen Honoraire	M. PUEL P.	Professeur Honoraire	M. CARTON
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL	Professeur Honoraire	Mme PUEL J.
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Y.	Professeur Honoraire	M. GOUZI
Doyen Honoraire	M. CHAP H.	Professeur Honoraire associé	M. DUTAU
Professeur Honoraire	M. COMMANAY	Professeur Honoraire	M. PONTONNIER
Professeur Honoraire	M. CLAUX	Professeur Honoraire	M. PASCAL
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE	Professeur Honoraire	M. MURAT
Professeur Honoraire	Mme ENJALBERT	Professeur Honoraire	M. SALVADOR M.
Professeur Honoraire	M. GAYRAL	Professeur Honoraire	M. SOLEILHAVOUP
Professeur Honoraire	M. PASQUIE	Professeur Honoraire	M. BONEU
Professeur Honoraire	M. RIBAUT	Professeur Honoraire	M. BAYARD
Professeur Honoraire	M. SARRASIN	Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE
Professeur Honoraire	M. GAY	Professeur Honoraire	M. FABIÉ
Professeur Honoraire	M. ARLET J.	Professeur Honoraire	M. BARTHE
Professeur Honoraire	M. RIBET	Professeur Honoraire	M. CABARROT
Professeur Honoraire	M. MONROZIES	Professeur Honoraire	M. GHISOLFI
Professeur Honoraire	M. MIGUERES	Professeur Honoraire	M. DUFFAUT
Professeur Honoraire	M. DALOUS	Professeur Honoraire	M. ESCAT
Professeur Honoraire	M. DUPRE	Professeur Honoraire	M. ESCANDE
Professeur Honoraire	M. FABRE J.	Professeur Honoraire	M. SARRAMON
Professeur Honoraire	M. FEDOU	Professeur Honoraire	M. CARATERO
Professeur Honoraire	M. LARENG	Professeur Honoraire	M. CONTÉ
Professeur Honoraire	M. DUCOS	Professeur Honoraire	M. ALBAREDE
Professeur Honoraire	M. GALINIER	Professeur Honoraire	M. PRIS
Professeur Honoraire	M. LACOMME	Professeur Honoraire	M. CATHALA
Professeur Honoraire	M. BASTIDE	Professeur Honoraire	M. BAZEX
Professeur Honoraire	M. COTONAT	Professeur Honoraire	M. ADER
Professeur Honoraire	M. DAVID	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE
Professeur Honoraire	Mme DIDIER	Professeur Honoraire	M. CARLES
Professeur Honoraire	M. GAUBERT	Professeur Honoraire	M. LOUVET
Professeur Honoraire	M. GUILHEM	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ
Professeur Honoraire	Mme LARENG M.B.	Professeur Honoraire	M. VAYSSE
Professeur Honoraire	M. BES	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. GUITARD
Professeur Honoraire	M. GARRIGUES	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES F.
Professeur Honoraire	M. REGNIER	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. CERENE
Professeur Honoraire	M. REGIS	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL
Professeur Honoraire	M. ARBUS	Professeur Honoraire	M. HOFF
Professeur Honoraire	M. LARROUY	Professeur Honoraire	M. REME
Professeur Honoraire	M. PUJOL	Professeur Honoraire	M. FAUVEL
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI	Professeur Honoraire	M. BOCCALON
Professeur Honoraire	M. RUMEAU	Professeur Honoraire	M. FREXINOS
Professeur Honoraire	M. PAGES	Professeur Honoraire	M. CARRIERE
Professeur Honoraire	M. BESOMBES	Professeur Honoraire	M. MANSAT M.
Professeur Honoraire	M. GUIRAUD	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. SUC	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC
Professeur Honoraire	M. COSTAGLIOLA	Professeur Honoraire	M. DELSOL
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE	Professeur Honoraire	Mme ARLET

**Professeurs émérites**

Professeur GHISOLFI	Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL
Professeur LARROUY	Professeur COSTAGLIOLA
Professeur ALBAREDE	Professeur L. LARENG
Professeur CONTÉ	Professeur JL. ADER
Professeur MURAT	Professeur Y. LAZORTHES
Professeur MANELFE	Professeur H. DABERNAT
Professeur LOUVET	Professeur F. JOFFRE
Professeur SOLEILHAVOUP	Professeur B. BONEU
Professeur SARRAMON	Professeur J. CORBERAND
Professeur CARATERO	Professeur JM. FAUVEL

**P.U. - P.H.**  
 Classe Exceptionnelle et 1ère classe

**P.U. - P.H.**  
 2ème classe

M. ADOUE D.	Médecine Interne, Gériatrie	Mme BEYNE-RAUZY O.	Médecine Interne
M. AMAR J.	Thérapeutique	M. BIRMES Philippe	Psychiatrie
M. ARNE J.L. (C.E)	Ophthalmologie	M. BRASSAT D.	Neurologie
M. ATTAL M. (C.E)	Hématologie	M. BUREAU Ch	Hépatogastro-entéro
M. AVET-LOISEAU H.	Hématologie	M. CALVAS P.	Génétique
M. BLANCHER A.	Immunologie (option Biologique)	M. CARRERE N.	Chirurgie Générale
M. BONNEVIALLE P.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.	Mme CASPER Ch.	Pédiatrie
M. BOSSAVY J.P.	Chirurgie Vasculaire	M. CHAIX Y.	Pédiatrie
M. BROUSSET P. (C.E)	Anatomie Pathologique	M. COGNARD C.	Neuroradiologie
M. BUGAT R. (C.E)	Cancérologie	M. FOURCADE O.	Anesthésiologie
M. CARRIE D.	Cardiologie	M. FOURNIE B.	Rhumatologie
M. CHAP H. (C.E)	Biochimie	M. FOURNIÉ P.	Ophthalmologie
M. CHAUVEAU D.	Néphrologie	M. GEERAERTS T.	Anesthésiologie - réanimation
M. CHOLLET F. (C.E)	Neurologie	Mme GENESTAL M.	Réanimation Médicale
M. CLANET M. (C.E)	Neurologie	Mme LAMANT L.	Anatomie Pathologique
M. DAHAN M. (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque	M. LAROCHE M.	Rhumatologie
M. DALY-SCHVEITZER N.	Cancérologie	M. LAUWERS F.	Anatomie
M. DEGUINE O.	O. R. L.	M. LEOBON B.	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DUCOMMUN B.	Cancérologie	M. MANSAT P.	Chirurgie Orthopédique
M. FERRIERES J.	Epidémiologie, Santé Publique	M. MAZIERES J.	Pneumologie
M. FRAYSSE B. (C.E)	O.R.L.	M. MOLINIER L.	Epidémiologie, Santé Publique
M. IZOPET J.	Bactériologie-Virologie	M. PARANT O.	Gynécologie Obstétrique
M. LIBLAU R.	Immunologie	M. PARIENTE J.	Neurologie
M. LANG T.	Biostatistique Informatique Médicale	M. PATHAK A.	Pharmacologie
M. LANGIN D.	Biochimie	M. PAUL C.	Dermatologie
M. LAUQUE D.	Médecine Interne	M. PAYOUX P.	Biophysique
M. MAGNAVAL J.F.	Parasitologie	M. PAYRASTRE B.	Hématologie
M. MALAVAUD B.	Urologie	M. PERON J.M.	Hépatogastro-entérologie
M. MARCHOU B.	Maladies Infectieuses	M. PORTIER G.	Chirurgie Digestive
M. MONROZIES X.	Gynécologie Obstétrique	M. RECHER Ch.	Hématologie
M. MONTASTRUC J.L. (C.E)	Pharmacologie	M. RONCALLI J.	Cardiologie
M. MOSCOVICI J.	Anatomie et Chirurgie Pédiatrique	M. SANS N.	Radiologie
Mme MOYAL E.	Cancérologie	M. SELVES J.	Anatomie Pathologique
Mme NOURHASHEMI F.	Gériatrie	M. SOL J-Ch.	Neurochirurgie
M. OLIVES J.P.	Pédiatrie	Mme WEBER-VIVAT M.	Biologie cellulaire
M. OSWALD E.	Bactériologie-Virologie		
M. PARINAUD J.	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.		
M. PERRET B. (C.E)	Biochimie		
M. POURRAT J.	Néphrologie		
M. PRADERE B.	Chirurgie Générale		
M. QUERLEU D. (C.E)	Cancérologie		
M. RAILHAC J.J. (C.E)	Radiologie		
M. RASCOL O.	Pharmacologie		
M. RISCHMANN P. (C.E)	Urologie		
M. RIVIERE D.	Physiologie		
M. SALES DE GAUZY J.	Chirurgie Infantile		
M. SALLES J.P.	Pédiatrie		
M. SERRE G. (C.E)	Biologie Cellulaire		
M. TELMON N.	Médecine Légale		
M. TREMOULET M.	Neurochirurgie		
M. VINEL J.P. (C.E)	Hépatogastro-entérologie		
		<b>P.U.</b>	
		M. OUSTRIC S.	Médecine Générale

**P.U. - P.H.**

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ABBAL M.	Immunologie
M. ALRIC L.	Médecine Interne
M. ARLET Ph. (C.E)	Médecine Interne
M. ARNAL J.F.	Physiologie
Mme BERRY I.	Biophysique
M. BOUTAULT F. (C.E)	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
M. BUSCAIL L.	Hépatogastro-entérologie
M. CANTAGREL A.	Rhumatologie
M. CARON Ph.	Endocrinologie
M. CHAMONTIN B. (C.E)	Thérapeutique
M. CHAVOIN J.P. (C.E)	Chirurgie Plastique et Reconstructive
M. CHIRON Ph.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mlle DELISLE M.B. (C.E)	Anatomie Pathologie
M. DIDIER A.	Pneumologie
M. DURAND D. (C.E)	Néphrologie
M. ESCOURROU J. (C.E)	Hépatogastro-entérologie
M. FOURTANIER G. (C.E)	Chirurgie Digestive
M. GALINIER M.	Cardiologie
M. GERAUD G.	Neurologie
M. GLOCK Y.	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GRAND A. (C.E)	Epidémiol. Eco. de la Santé et Prévention
Mme HANAIRE H.	Endocrinologie
M. LAGARRIGUE J. (C.E)	Neurochirurgie
M. LARRUE V.	Neurologie
M. LAURENT G. (C.E)	Hématologie
M. LEVADE T.	Biochimie
M. MALECAZE F. (C.E)	Ophtalmologie
Mme MARTY N.	Bactériologie Virologie Hygiène
M. MASSIP P.	Maladies Infectieuses
M. MAZIERES B.	Rhumatologie
M. PESSEY J.J. (C.E)	O. R. L.
M. PLANTE P.	Urologie
M. PUGET J. (C.E.)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. RAYNAUD J-Ph.	Psychiatrie Infantile
M. REME J.M.	Gynécologie-Obstétrique
M. RITZ P.	Nutrition
M. ROCHE H. (C.E)	Cancérologie
M. ROSTAING L.	Néphrologie
M. ROUGE D. (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU H.	Radiologie
M. SALVAYRE R. (C.E)	Biochimie
M. SCHMITT L. (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD J.M.	Pharmacologie
M. SERRANO E.	O. R. L.
M. SOULIE M.	Urologie
M. SUC B.	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER M.T.	Pédiatrie
M. VELLAS B. (C.E)	Gériatrie

**P.U. - P.H.**

2ème classe

M. ACCADBLE F.	Chirurgie Infantile
M. ACAR Ph.	Pédiatrie
Mme ANDRIEU S.	Epidémiologie
M. BERRY A.	Parasitologie
M. BONNEVILLE F.	Radiologie
M. BROUCHET L.	Chir. Thoracique et cardio-vasculaire
M. BUJAN L.	Uro-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE A.	Médecine Vasculaire
M. CHAYNES P.	Anatomie
M. CHAUFOUR X.	Chirurgie Vasculaire
M. CONSTANTIN A.	Rhumatologie
M. COURBON	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI M.	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN C.	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DE BOISSESON X.	Médecine Physique et Réadaptation
M. DECRAMER S.	Pédiatrie
M. DELABESSE E.	Hématologie
M. DELORD JP.	Cancérologie
M. ELBAZ M.	Cardiologie
M. GALINIER Ph.	Chirurgie Infantile
M. GARRIDO-STÖWHAS I.	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET A.	Anatomie Pathologique
M. GOURDY P.	Endocrinologie
M. GROLLEAU RAOUX J.L.	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD R.	Cancérologie
M. KAMAR N.	Néphrologie
M. LAFOSSE JM.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. LEGUEVAQUE P.	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. MARQUE Ph.	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MAZEREEUW J.	Dermatologie
M. MINVILLE V.	Anesthésiologie Réanimation
M. MUSCARI F.	Chirurgie Digestive
M. OTAL Ph.	Radiologie
M. ROLLAND Y.	Gériatrie
M. ROUX F.E.	Neurochirurgie
M. SAILLER L.	Médecine Interne
M. SOULAT J.M.	Médecine du Travail
M. TACK I.	Physiologie
M. VAYSSIERE Ch.	Gynécologie Obstétrique
M. VERGEZ S.	O.R.L.
Mme URO-COSTE E.	Anatomie Pathologique

Professeur Associé de Médecine Générale  
Dr VIDAL M.

Professeur Associé en Soins Palliatifs  
Dr MARMET Th.

Professeur Associé de Médecine du Travail  
Dr NIEZBORALA M.

**M.C.U. - P.H.**

M. APOIL P. A	Immunologie
Mme ARNAUD C.	Epidémiologie
M. BIETH E.	Génétique
Mme BONGARD V.	Epidémiologie
Mme COURBON C.	Pharmacologie
Mme CASPAR BAUGUIL S.	Nutrition
Mme CASSAING S.	Parasitologie
Mme CONCINA D.	Anesthésie-Réanimation
M. CONGY N.	Immunologie
M. CORRE J.	Hématologie
M. COULAIS Y.	Biophysique
Mme DAMASE C.	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY I.	Physiologie
Mme DELMAS C.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme DE-MAS V.	Hématologie
M. DUBOIS D.	Bactériologie-Virologie
Mme DUGUET A.M.	Médecine Légale
Mme DULY-BOUHANICK B.	Thérapeutique
M. DUPUI Ph.	Physiologie
Mme FAUVEL J.	Biochimie
Mme FILLAUX J.	Parasitologie
M. GANTET P.	Biophysique
Mme GENNERO I.	Biochimie
M. HAMDI S.	Biochimie
Mme HITZEL A.	Biophysique
M. JALBERT F.	Stomato et Maxillo Faciale
M. KIRZIN S.	Chirurgie Générale
Mme LAPEYRE-MESTRE M.	Pharmacologie
M. LAURENT C.	Anatomie Pathologique
Mme LE TINNIER A.	Médecine du Travail
M. LOPEZ R.	Anatomie
M. MONTOYA R.	Physiologie
Mme MOREAU M.	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
M. PILLARD F.	Physiologie
Mme PRERE M.F.	Bactériologie Virologie
Mme PUISSANT B.	Immunologie
Mme RAGAB J.	Biochimie
Mme RAYMOND S.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY F.	Biochimie
Mme SAUNE K.	Bactériologie Virologie
M. SOLER V.	Ophtalmologie
Mme SOMMET A.	Pharmacologie
M. TAFANI J.A.	Biophysique
Mlle TREMOLLIERES F.	Biologie du développement
M. TRICOIRE J.L.	Anatomie et Chirurgie Orthopédique
M. VINCENT C.	Biologie Cellulaire

**M.C.U. - P.H.**

Mme ABRAVANEL F.	Bactério. Virologie Hygiène
Mme ARCHAMBAUD M.	Bactério. Virologie Hygiène
M. BES J.C.	Histologie - Embryologie
M. CAMBUS J.P.	Hématologie
Mme CANTERO A.	Biochimie
Mme CARFAGNA L.	Pédiatrie
Mme CASSOL E.	Biophysique
Mme CAUSSE E.	Biochimie
M. CHASSAING N	Génétique
Mme CLAVE D.	Bactériologie Virologie
M. CLAVEL C.	Biologie Cellulaire
Mme COLLIN L.	Cytologie
M. DEDOUIT F.	Médecine Légale
M. DE GRAEVE J.S.	Biochimie
M. DELOBEL P.	Maladies Infectieuses
M. DELPLA P.A.	Médecine Légale
M. EDOUARD T	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Y.	Médecine du travail
Mme ESCOURROU G.	Anatomie Pathologique
Mme GALINIER A.	Nutrition
Mme GARDETTE V.	Epidémiologie
Mme GRARE M.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER C.	Anatomie Pathologique
M. HUYGHE E.	Urologie
Mme INGUENEAU C.	Biochimie
M. LAHARRAGUE P.	Hématologie
M. LAPRIE Anne	Cancérologie
M. LEANDRI R.	Biologie du dével. et de la reproduction
M. MARCHEIX B.	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mme MAUPAS F.	Biochimie
M. MIEUSSET R.	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme PERIQUET B.	Nutrition
Mme PRADDAUDE F.	Physiologie
M. PRADERE J.	Biophysique
M. RAMI J.	Physiologie
M. RIMAILHO J.	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES M.	Anatomie - Chirurgie orthopédique
M. TKACZUK J.	Immunologie
M. VALLET P.	Physiologie
Mme VEZZOSI D.	Endocrinologie
M. VICTOR G.	Biophysique
M. BISMUTH S.	<b>M.C.U.</b> Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr MESTHÉ P.  
Dr STILLMUNKES A.  
Dr BRILLAC Th.  
Dr ABITTEBOUL Y.

Dr ESCOURROU B.  
Dr BISMUTH M.  
Dr BOYER P.

## **Remerciements**

Monsieur le Professeur Vincent LARRUE,

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Neurologie

Je vous remercie de m'avoir offert la possibilité de réaliser ce travail.

Je vous remercie de l'enseignement que vous m'avez donné pendant mon internat. J'ai eu la chance de travailler dans votre service pendant six mois et c'est grâce à cela que la neurologie vasculaire s'est imposée à moi.

Je suis honorée de vous voir présider ce jury.

Je vous prie de bien vouloir recevoir ma plus sincère gratitude et mon profond respect.

Monsieur le Professeur Jean FERRIERES,

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Cardiologie

Merci d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et de me permettre de bénéficier de votre expertise sur ce sujet.

Je vous prie de recevoir l'assurance de ma respectueuse considération.

Monsieur le Professeur Pierre SIE,

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Hématologie

Vous avez accepté de siéger à ce jury de thèse et je vous en remercie. Mon passage dans votre service m'a beaucoup apporté et m'a permis de réaliser cette étude.

Soyez assuré de ma respectueuse considération.

Madame le Docteur Françoise MAUPAS-SCHAWN,

Maître de Conférences des Universités

Praticien Hospitalier

Biochimie

Merci de la confiance et du temps que vous m'avez accordés pour mener à bien ce travail.

Merci de votre spontanéité et de votre générosité.

Soyez assurée de mon profond respect et de toute ma gratitude.

Monsieur le Docteur Alain VIGUIER,

Praticien Hospitalier

Neurologie

Alain,

C'est toi qui m'as donné la passion de ce métier.

Merci pour ta disponibilité, pour ton soutien, et pour ta vision toujours optimiste, quoiqu'il arrive.

Tu m'as beaucoup appris et je t'en remercie.

Je suis profondément honorée que tu puisses aujourd'hui juger ce travail de thèse.

Monsieur le Professeur Bernard PAYRASTRE,

Professeur des Universités

Hématologie

Directeur d'une équipe de recherche (Unité INSERM 1048, équipe 11)

Bernard,

Tu as accepté de siéger aujourd'hui à ce jury et j'en suis honorée.

J'ai eu la chance de travailler avec toi pendant un an et tu m'as fait découvrir le monde passionnant de la recherche.

Merci du temps que tu m'as consacré pour la réalisation de ce travail.

Je te pris d'accepter ma profonde gratitude.

*Et sans oublier...*

**A tous les patients** qui ont accepté de participer à cette étude, merci !

**A l'ensemble de l'équipe du doppler**, merci à **Brigitte** pour ta gentillesse et ta patience, merci à **Nathalie N.** pour m'avoir encadré dans ce travail avec enthousiasme, merci à **Nathalie, Valérie, Hélène** et **Dominique** pour votre accueil si chaleureux.

**Au service de Biochimie**, merci à **l'ensemble des techniciens** et particulièrement au **Dr Jean-Marie Botella** pour les dosages de la Lp-PLA2. Sans vous, cette étude n'aurait pas eu lieu.

**Au service d'Hématologie/Hémostase**, un grand, grand merci à **Cédric** qui m'a tout appris (du vortex à la cytométrie) et qui m'a supporté pendant cette année de master 2 (avec toutes ses galères!) Merci à **Sophie Voisin** pour ta bonne humeur et ta disponibilité.

**A toute l'équipe INSERM de Bernard Payraastre**, merci de m'avoir réservé un accueil si chaleureux l'an dernier pour mon Master 2. Merci à **Jean Marie** pour l'intérêt que tu as porté à ce travail et pour les magnifiques photos des agrégats leucocytes-plaquettes que tu as réalisées.

**Au laboratoire Eurobio, et en particulier à Mr Billard Jérôme**, merci de nous avoir offert les kits de dosage de la lipoprotéine associée à la phospholipase A2 utilisés pour cette thèse.

**A toutes les équipes soignantes des services de Neuro 43, Neuro 41, Neuro C, explorations fonctionnelles** : infirmiers, aides-soignants, ASH, secrétaires, kinés, assistantes sociales, ... merci d'être là et de garder le sourire. Merci à **Aude, Lalla, Noélie, Emilie, les 2 Mathieu, Marlène, Viviane, Jean Claude, Babeth, Corinne, Jean Marie, Isabelle, Véronique, Marie Carmen, Adeline, Yolande, Christelle, Muriel, Virginie, Céline, Cécile, Benjamin, Eric, Tony, Anthony, Mireille, Martine, Nathalie, Josh, Séverine, Vicente** et les autres... Un petit clin d'œil à **Guylaine, Marie-Pierre et Corine** pour ces folles nuits !

**A Marie, Luc, Nelly, Pascal, Michel, Charles, Nicolas B., Lionel, Nicolas R., Jean-Francois, Jérémie, Fabienne, Angélique, Alexandra, Géraldine, Françoise, Sandra, Fred., Thomas, Nathalie H., Hélène, Julie, Monelle, Jean-Christophe, Patrick, Tiphaine, Laurent.** Merci de m'avoir tant appris tout au long de ma formation.

**A Anne Claire.** Tu as été la première à me faire découvrir la neurologie. Sans mon passage en Neuro B, je ne serai peut-être pas ici.

**A Rachel,** merci pour ton soutien et tes précieux conseils.

**A mes chers co-internes : Nawel, Blandine, Benjamin, Aude, Marie L., Julia, Delphine, Emilie, Clara, Marie B., Fleur** pour cette aventure partagée. Merci aux plus jeunes **Paul, Cédric, Catherine et Benjamin** de m'avoir libéré du temps pour que je termine la rédaction de cette thèse. Merci à **Jonathan** pour tout ce que tu as fait pour les internes de neurologie toulousains ! Je suis heureuse de pouvoir travailler avec toi dans 6 mois. Merci à **Yannick**, mon prof de PL! Merci à **Carole** pour ce semestre en Neurologie 43 et ces fous-rires partagés. Merci à **Catherine** et à **Virginie** pour votre soutien tout au long de ces années d'internat. Excel n'a plus de secret pour moi grâce à toi, Virginie, merci.

**A ces belles rencontres faites pendant ces années d'internat : Corinne, Sophie M. et Yohan, Benjamin et Sandrine, Benoit et Delphine, Etienne et Aure, Audrey, Sophie P. et Benjamin, Charlotte et Benjamin.** J'espère que nos routes respectives ne nous éloignerons pas.

**A mes amis de fac: Emilie, Olivier, Margot, Laurent, Claire, Rody.** Merci pour ces belles années... j'espère qu'il y en aura beaucoup d'autres. Merci à **Aline** pour toutes ces journées à travailler (et un peu à bavarder...) pour nos master 2 puis nos thèses. Quelle sera la prochaine étape? Merci de ton aide précieuse pour la réalisation de cette bibliographie (End note ne t'as pas découragé !). **A Vir, Vivi et Yoyo**, pour tous ces moments partagés : les tours du jardin des plantes à refaire le monde, les soirées arrosées, les tartes au citron ratées!.. Merci à **Sandra** de m'avoir toujours accueillie avec le sourire lors de mes passages à Paris.

**A mes amies d'enfance : Steph B., Marie et Valérie** qui savent me faire prendre du recul sur les choses importantes de la vie.

**A mes amies de toujours, mes grandes sœurs, Fanny et Stéphanie,** (et oui quoi qu'il arrive vous serez toujours plus vieilles que moi !). Merci pour tous les fous-rires et les coups de blues partagés. A quand le prochain week-end entre filles à manger des spaghettis en chantant « Non, les braves gens n'aiment pas que, on suive une autre route qu'eux.. » ?

**A la bande des filles Nini, Betty et Anne Marie**, les 3 fées de Pénélope. **A Coco et Jean-Pierre. A ma tante Paule**, à **mon oncle Jean-Lou**, à mes cousins et cousines **Cécile, Greg, Sandrine, Alban, Cédric et Véro** et mes petits cousins **Martin, Anna, Nathan** et la petite dernière **Zoé**. Merci pour votre présence.

**A mon frère Bruno et sa moitié Céline**, merci d'être tels que vous êtes. Surtout ne changez pas !

**A ma tatie Nane**, qui malheureusement n'est plus là aujourd'hui, merci pour ton soutien pendant ces premières et difficiles années de médecine et pour tous ces merveilleux moments (les soirées resto-ciné, les après-midi shopping, les vacances à Moliets...). Sois sure que je ne t'oublie pas.

**A Mamie**, merci d'être une grand-mère formidable et d'avoir toujours ces petites attentions pour moi (pâtes « rouges », pizza, beignets au nutella...).

**A Maman et Papa** (ours), tant de choses à dire... Merci pour votre présence et votre soutien quotidien. Vous m'avez offert à la fois un socle sur lequel j'ai pu grandir et m'épanouir, à la fois un nid où me réfugier, me reposer, me ressourcer.... Merci.

**A Raphael**, l'amour de ma vie. Sans toi, je n'en serai pas là aujourd'hui. Merci pour ton amour, ta patience, ton soutien. Merci de remplir ma vie de bonheur, un peu plus chaque jour.

**A Pénélope**, ma cacahuète, qui fait crépiter ma vie de maman, comme je n'aurai pu l'imaginer.

## Serment d'Hippocrate

*En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.*

*Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.*

*Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe. Ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

## **Table des matières**

Table des matières .....	1
Abréviations .....	3
I. Introduction.....	6
A. Sténose carotidienne athéromateuse .....	6
1. Epidémiologie.....	6
2. Comment quantifier le degré de la sténose carotidienne ? .....	6
3. Prise en charge des patients ayant une sténose athéromateuse de la carotide .....	11
B. Microembolisation cérébrale .....	14
1. Généralités .....	14
2. Diagnostic .....	14
3. Situations cliniques associées à la présence de MES .....	17
4. A quoi correspondent ces MES en réalité?.....	19
5. Cas particulier des sténoses athéromateuses de la carotide.....	19
C. La lipoprotéine associée à la phospholipase A2 .....	23
1. Lp-PLA2 : au croisement du métabolisme lipidique et de la réponse inflammatoire.....	23
2. La Lp-PLA2 : marqueur d'instabilité de la plaque.....	24
3. Lp-PLA2 : facteur de risque indépendant d'événements vasculaires.....	25
4. Lp-PLA2 : facteur de risque de récurrence d'événements vasculaires .....	26
5. Stabilité du dosage de la Lp-PLA2.....	27
D. But de l'étude.....	28
II. Matériels et Méthodes .....	29
A. Cadre du protocole.....	29
B. Population de l'étude .....	31
1. Patients.....	31
2. Témoins .....	33
C. Etude doppler.....	33
1. Sténose carotidienne .....	33
2. Recherche de MES .....	34
D. Echantillons sanguins .....	34
1. Lp-PLA2.....	35
2. Agrégats leuco-plaquettaires .....	35
3. Signalisation cellulaire impliquée dans l'activation plaquettaire .....	37

E.	Analyse statistique.....	40
III.	Résultats .....	41
A.	Caractéristiques générales des patients.....	41
1.	Caractéristiques cliniques des patients .....	41
2.	MES, échographie et biologie chez les patients .....	41
B.	Dosage de l'activité enzymatique de la Lp-PLA2.....	46
1.	Résultats concernant l'ensemble des patients inclus dans l'étude.....	46
2.	Résultats concernant les patients non traités par statines .....	53
C.	Agrégats leuco-plaquettaire .....	58
1.	Population étudiée .....	58
2.	Comparaison des sous-groupes : MES+, MES- et témoins.....	58
3.	Agrégats leuco-plaquettaire et données clinico-biologiques .....	60
D.	Signalisation plaquettaire .....	61
1.	Validation de la méthode au plan expérimental .....	61
2.	Résultats de l'analyse de la signalisation cellulaire par la cytométrie de flux dans notre étude.....	62
E.	Evolution à un mois des patients inclus dans l'étude.....	65
IV.	Discussion et Perspectives .....	67
A.	La microembolisation cérébrale .....	67
B.	MES et Lp-PLA2.....	69
C.	MES et agrégats leucoplaquettaire.....	71
D.	MES et voies d'activation plaquettaire.....	73
E.	Risque de récurrence d'événement cérébrovasculaire.....	75
F.	Limites de l'étude.....	75
V.	Conclusion générale .....	77
	Bibliographie.....	78
	Annexes.....	88
	Annexe 1: Les interactions leucocytes-plaquettes.....	89
	Annexe 2: Différentes voies d'activation plaquettaire.....	92
	Annexe 3: Score NIHSS .....	98
	Annexe 4 : Fiche d'information remise au patient .....	100
	Annexe 5: Fiche de consentement libre et éclairé signé par les patients.....	103
	Annexe 6 : Avis du comité d'éthique .....	105

## Abréviations

**AAP:** AntiAgrégant Plaquettaire

**AC:** Adenyl Cyclase

**Ac:** Anticorps

**ADP:** Adenosyl DiPhosphate

**ACM:** Artère Cérébrale Moyenne

**ACC:** Artère Carotide Commune

**AIC:** Accident Ischémique Constitué

**AIT:** Accident Ischémique Transitoire

**Apo-B100:** Apolipoprotéine B 100

**ARM:** Angiographie par Résonnance Magnétique

**ARN m:** Acide RuboNucléique messenger

**ATCD:** AnTéCéDents

**AVC:** Accident Vasculaire Cérébral

**Ca<sup>2+</sup>:** Calcium

**CRP:** Protéine C Réactive

**CRP\*:** Collagen Related Peptide

**DAG:** DiAcylGlycérol

**ECD:** phycoerythrin-Texas Red conjugate

**ECG:** ElectroCardioGramme

**EP2:** prostaglandin EP receptor

**FA:** Fibrillation Auriculaire

**FDR CV:** Facteur De Risque Cardio-Vasculaire

**FFT:** Fast Fournier Transform

**Fg:** Fibrinogène

**FITC:** fluorescein isothiocyanate

**FOP:** Foramen Ovale Perméable

**FT:** Facteur Tissulaire

**GB:** Globules Blancs

**Gp1b IX V:** GlycoProtéine 1b IX V

**GP VI:** GlycoProtéine VI

**GR:** Globules Rouges  
**HbA1C:** Hémoglobine A1C  
**HDL:** High Density Lipoprotein  
**HITS:** signaux transitoires de haute intensité (High Intensity Transient Signals)  
**HTA:** HyperTension Artérielle  
**ICAM:** Intercellularcell adhesion molecule 1  
**IDM:** Infarctus Du Myocarde  
**Ig:** Immunoglobuline  
**Il 6 et Il 8:** Interleukine 6 et Interleukine 8  
**IMC:** Indice de Masse Corporelle  
**IP3:** Inositol trisphosphate  
**IRM:** Imagerie par Résonance Magnétique  
**ICAM :** Intercellular Cell Adhesion Molecule  
**ITAM:** Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif  
**LAT:** linker of adaptation of T cell  
**LDL:** Low Density Lipoprotein  
**LIMK:** LIM Kinase  
**Lp(a):** Lipoparticule (a)  
**Lp-PLA2:** Lipoprotéine PhosphoLipase A2  
**Lyso-PC:** LysoPhosphatidylCholine  
**Mac 1:** Macrophage 1 Antigene  
**MAP-kinase:** Mitogene Activated Protein kinase  
**MCP1:** Monocyte Chimoattractant Protein 1  
**MES:** signaux microemboliques (MicroEmbolic Signals)  
**MFI:** Moyenne d'Intensité de Fluorescence  
**MLC:** chaine légère de la myosine  
**MMP9:** Matrix MetalloPeptidase9  
**NEFAs:** acides gras non estérifiés (Non Esterified Fatty Acids)  
**NFS:** Numération Formule Sanguine  
**NIHSS:** National Institute of Health Stroke Score  
**n.s.:** non significatif  
**PBS:** Phosphate Buffered Saline  
**PE:** PhycoErythrin  
**PerCP-Cy5.5:** Peridinin chlorophyll-A protein + cyanine 5,5

**PET- FDG:** Tomographie par Emission de Positons après injection de <sup>18</sup>FluoroDésoxyGlucose

**PF4:** Platelet Factor 4

**PGE1:** ProstaGlandine E1

**PI-3-kinase:** PhosphoInositide 3 kinase

**PI 4,5 P2:** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

**PKC:** Proteine Kinase C

**PI:** Plaquettes

**PLA2:** Phospholipase A2

**PLC:** PhosphoLipase C

**PNN:** Polynucléaires Neutrophiles

**PRP:** Plasma Riche en Plaquettes

**PSGL1:** P-Sélectine Glycoprotein Ligand 1

**PSV:** Pic de Vitesse Systolique

**RANTES:** Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted

**Rho K:** Rho Kinase

**SLP76:** Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa

**TDM:** TomoDensitoMétrie

**TRAP:** Thrombin Receptor Activating Peptide

**TXA2:** TromboXane A2

**VASP:** VasoActive Stimulated Protein

**VCAM:** Vascular Cell Adhesion Molecule 1

**VTD:** Vitesse TéléDiastolique

**vWF ou FVW:** Facteur von Willebrand

# **I. Introduction**

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont un problème majeur de santé publique: ils représentent la 1<sup>ère</sup> cause de handicap, la 2<sup>ème</sup> cause de démence et la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité (après les cardiopathies et les cancers) dans les pays industrialisés. Pour les accidents ischémiques cérébraux (AIC), les deux étiologies les plus fréquentes sont l'athérosclérose des gros troncs artériels et la fibrillation auriculaire (FA). L'athérosclérose des artères carotides est responsable d'environ 20 à 30% des accidents vasculaires ischémiques cérébraux (1, 2).

## **A. Sténose carotidienne athéromateuse**

### **1. Epidémiologie**

Dans la population générale, 5,7% des personnes âgées de 70 à 80 ans et 9,5% des personnes de plus de 80 ans présentent une sténose athéromateuse de la carotide supérieure à 50%. Des études anciennes estimaient que le risque à 2 ans d'accident ischémique cérébral ipsilatéral à la sténose était est de 4%. Des études plus récentes montrent que ce risque a diminué à 0,7% (3, 4) du fait d'une meilleure prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaires (FDR CV).

### **2. Comment quantifier le degré de la sténose carotidienne ?**

L'évaluation par échographie Doppler permet de mesurer le degré de sténose de deux manières, soit par l'étude vélocimétrique à l'aide du doppler pulsé avec les précautions d'usage (angle d'incidence du tir Doppler  $<60^\circ$ , correction de l'angle, largeur de porte), soit par la mesure en échographie mode B et Doppler couleur (planimétrie). En étude vélocimétrique (5), une sténose carotidienne entre 50% et 70% est diagnostiquée si le pic de vitesse systolique est compris entre 125 cm/s et 230 cm/s, la vitesse en fin de diastole entre 40 cm/s et 100cm/s, et le ratio systolique entre 2 et 4. Une sténose supérieure à 70% est diagnostiquée si le pic de vitesse systolique est supérieur ou égal à 230 cm/s, la vitesse en fin de diastole supérieure ou égale à 100 cm/s, et le ratio systolique supérieur ou égal à 4 (**Tableau 1**). L'utilisation d'autres paramètres hémodynamiques comme l'index de résistance

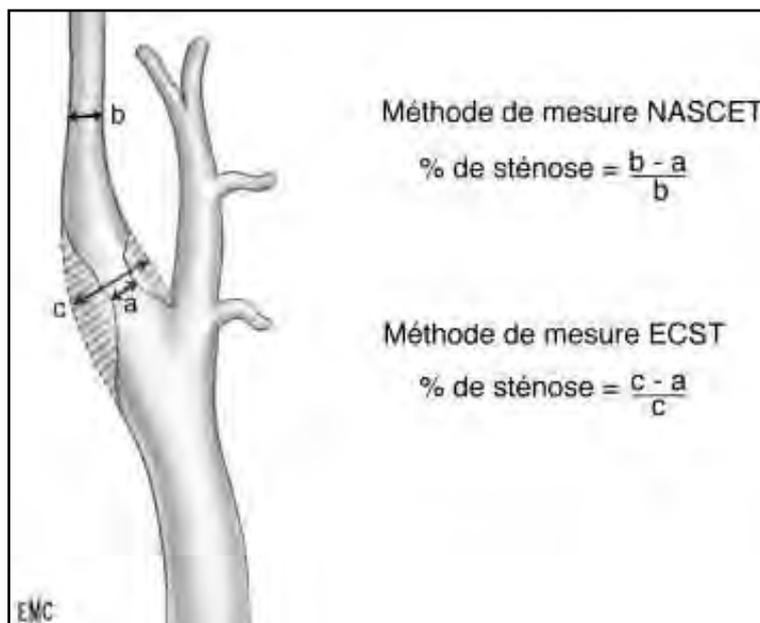
(IR= (Vitesse systolique – Vitesse diastolique)/Vitesse systolique) au niveau de l'artère carotide commune ou l'enregistrement de l'artère ophtalmique ou du polygone de Willis peut améliorer la sensibilité de cette méthode. L'étude planimétrique mesure le diamètre antéropostérieur intima-intima au niveau du bulbe sténosé et au niveau de l'artère carotide interne post sténotique. Le degré de sténose est exprimé en utilisant l'une des 2 méthodes validées en angiographie soit la méthode nord-américaine NASCET (North American Symptomatic Carotid Trial)  $(B-A/B \times 100)$  (6) soit la méthode européenne ECST (European Carotid Surgical Trial)  $(C-A/C \times 100)$  (7) (**Figure 1**).

**Tableau. Sténose artère carotide :  
échelle des gris et critères Doppler**  
(Conférence de consensus 2003. Radiology 2003 ; 229 : 340-6)

Degré de sténose (%)	Paramètres primaires		Paramètres additionnels	
	ACI PSV (cm/sec)	Estimation de la plaque (%)	ACI/ACC PSV Ratio	ACI VTD (cm/sec)
Normal	< 125	–	< 2,0	< 40
< 50	< 125	< 50	< 2,0	< 40
50-69	125-230	≥ 50	2,0-4,0	40-100
≥ 70 mais moindre qu'une sub-occlusion	> 230	≥ 50	> 4,0	> 100
Sub-occlusion	Haute, basse ou indétectable	Visible	Variable	Variable
Occlusion totale	Indétectable	Visible, lumière non observable	Non applicable	Non applicable

ACI : artère carotide interne, PSV : pic de vélocité systolique, VTD : vitesse télédiastolique, ACC : artère carotide commune.

**Tableau 1 : Critères diagnostiques des sténoses carotidiennes (5)**



**Figure 1 : Evaluation du degré d'une sténose carotidienne d'après l'angiographie.**

**NASCET: North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial ; ECST:**

**European Carotid Surgery Trial.**

Les résultats obtenus avec les deux méthodes sont fortement corrélés mais non identiques. La comparaison des degrés de sténose évalués par chaque méthode permet d'établir une correspondance entre les deux méthodes (**Tableau 2**).

NASCET	ECST
40%	70%
50%	75%
60%	80%
70%	85%
80%	90%

**Tableau 2 : Mesure du degré de sténose de l'artère carotide interne avec les méthodes NASCET et ECST.**

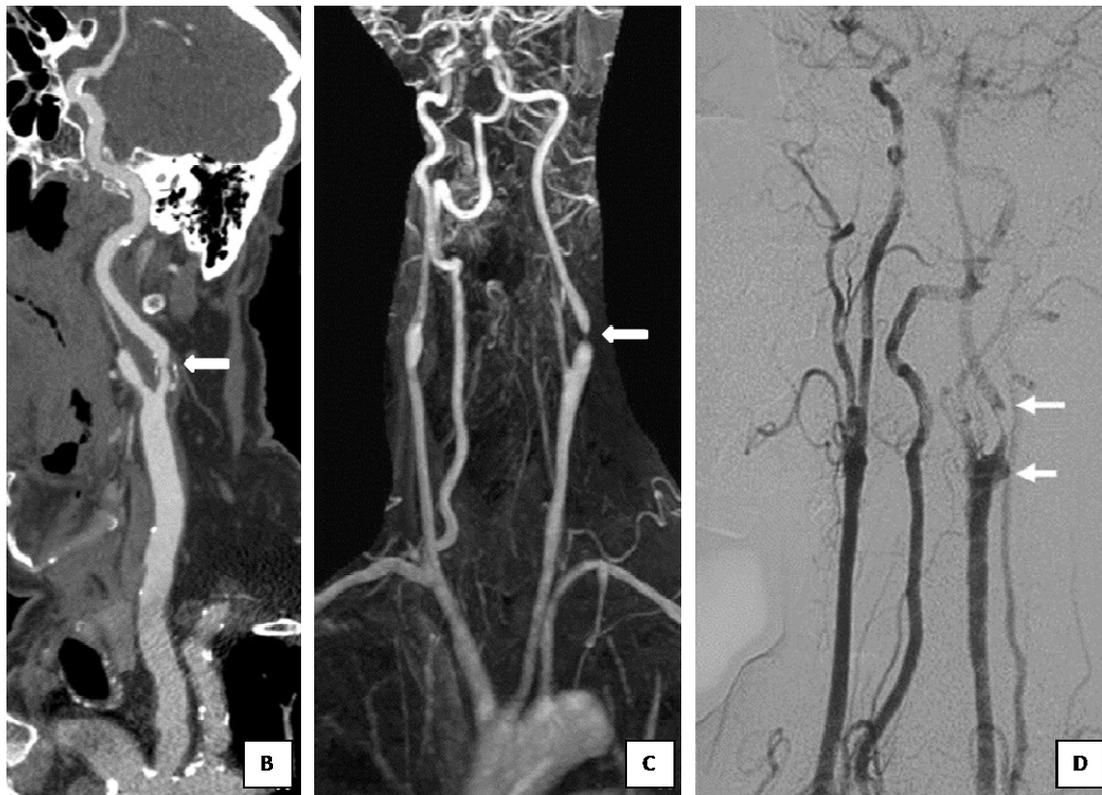
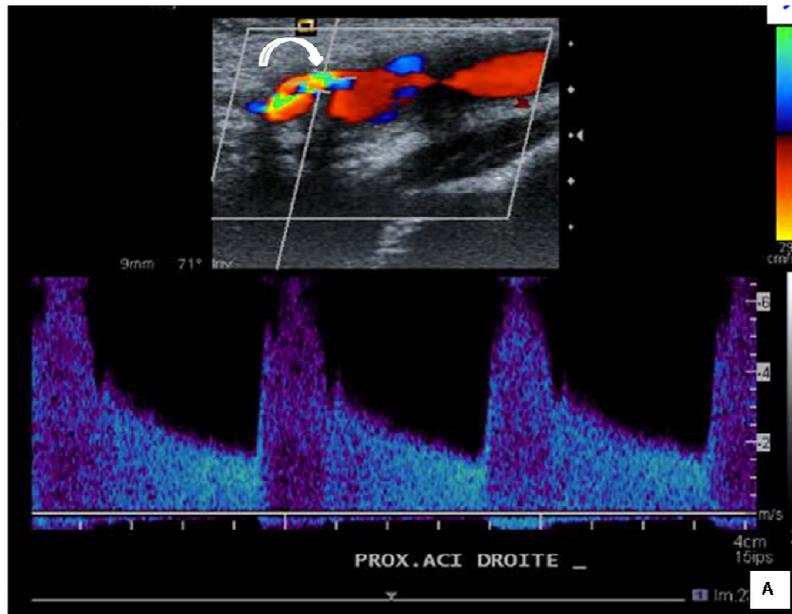
Même si les évaluations vélocimétrique et planimétrique sont concordantes, la méthode vélocimétrique reste la méthode de référence.

L'échodoppler permet également une analyse morphologique de la plaque : la localisation, l'échogénicité (iso, hyper, hypo ou anéchogène), le caractère homogène ou hétérogène, le caractère régulier, irrégulier ou ulcéré de la plaque, l'existence d'un thrombus sur plaque. Les plaques à prédominance hypoéchogène ont un signal hypointense à l'échographie et sont associées à une composante lipidique importante et à une possible hémorragie intra-plaque. Elles sont considérées comme des plaques à risque d'embolies cérébrales. Les plaques à prédominance hyperéchogène ont un signal hyperintense à l'échographie et sont associées à une composante calcique importante. Elles sont considérées comme des plaques stables (8).

Le calcul du degré de sténose en angioscanner et en angiographie par résonance magnétique (ARM) après injection de gadolinium se fait grâce aux critères NASCET et ECST à partir de l'analyse des images en coupes axiales et après reconstruction en trois dimensions ou en multiplanaire. L'angioscanner carotidien permet une bonne résolution spatiale mais les calcifications peuvent gêner son interprétation. Il permet une analyse de la structure de la plaque. L'ARM avec injection de gadolinium a une sensibilité et une spécificité excellentes pour le diagnostic des sténoses carotidiennes sévères. Le diagnostic d'occlusion carotidienne est également très fiable avec cette technique. Par contre, elle peut, dans certains cas, surestimer le degré de sténose.

L'artériographie conventionnelle tétra pédiculaire était l'examen de référence mais elle présente des risques estimés à 1% dans l'étude ACAS (9). Elle est rarement réalisée actuellement.

Il est recommandé d'associer deux examens parmi échodoppler, ARM ou angioscanner. En cas de discordance des résultats, un troisième examen doit être réalisé (**Figure 2**).



**Figure 2 : Visualisation d'une sténose de la carotide interne en échodoppler (A), en angioTDM (reconstruction 2D) (B), en ARM (reconstruction 3D MIP) (C) et en artériographie (D).**

### 3. Prise en charge des patients ayant une sténose athéromateuse de la carotide

#### **a) Sténose carotidienne asymptomatique**

##### (1) Traitement médical

Un traitement médical optimal doit être proposé aux patients présentant une sténose asymptomatique de la carotide. Un traitement par antiagrégant plaquettaire doit être prescrit (aspirine ou clopidogrel) associé à une prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaires. Un traitement par statine doit être associé même en l'absence de dyslipidémie. Un équilibre optimal de la tension artérielle et du diabète doit être recherché. Le tabagisme doit être interrompu. Une perte de poids pour les patients en surpoids ou obèse et une activité physique régulière sont recommandées.

Il faut également informer les patients du risque d'AIT ou d'AIC et leur expliquer comment reconnaître les symptômes évocateurs afin d'être dirigé le plus rapidement possible vers une unité de neurologie vasculaire.

Une surveillance clinique et par échographie doppler doit leur être proposée afin de ne pas méconnaître un événement neurologique passé inaperçu, de contrôler leurs facteurs de risques cardiovasculaires, et d'évaluer la progression de la plaque carotidienne.

##### (2) Traitement radical

Le traitement radical des sténoses asymptomatiques de la carotide par endartériectomie ou par angioplastie est très débattu (9).

L'étude ACAS (9) en 1995 a évalué le risque du traitement médical seul versus traitement chirurgical chez 1662 patients âgés de 40 à 79 ans ayant une sténose asymptomatique de la carotide. A 5 ans, il existait une diminution du risque d'AVC ipsilatéral à la sténose dans le groupe « traitement chirurgical » par rapport au groupe « traitement médical » mais il n'y avait pas de diminution du risque d'AVC ipsilatéral sévère ou de décès. L'étude ACST (10) a inclus 3120 patients ayant une sténose carotidienne asymptomatique supérieure à 60%. Le bénéfice de la chirurgie était prouvé avec une diminution du risque d'AVC de 4,1% à 5ans et de 4,6% à 10 ans. Cependant, le risque de la chirurgie était de 3%. L'étude CREST (11) a comparé l'endartériectomie versus l'angioplastie

de la carotide chez 1181 patients ayant une sténose carotidienne asymptomatique. L'angioplastie est associée à une augmentation du risque d'AVC per-opératoire ou à 4 ans et de décès par rapport au groupe « endartériectomie ».

La décision du traitement radical des sténoses asymptomatiques se prend donc au cas par cas. Cependant, certains patients seraient plus susceptibles d'obtenir un bénéfice de la chirurgie : les hommes (12), les patients âgés de moins de 75 ans ou ayant une espérance de vie de plus de 5 ans (10), la progression de la sténose plus que le degré de sténose (13), l'existence d'un infarctus cérébral silencieux, l'existence d'un retentissement hémodynamique (par mesure de la vasoréactivité cérébrale à l'hypercapnie au doppler transcrânien) (14), la présence de signaux microemboliques (MES) en aval de la sténose (15), une plaque de composition lipidique et avec la présence d'hémorragies intra-plaque (visible à l'échodoppler ou à l'IRM de plaque) ou inflammatoire (mesurée par tomographie par émission de positons après injection de <sup>18</sup>FluoroDésoxyGlucose (PET-FDG)). Si la décision d'un traitement radical est prise, le traitement chirurgical sera privilégié. Le traitement par angioplastie sera réservé aux patients ayant des contre-indications à la chirurgie, ou ayant une sténose inaccessible ou une sténose radique (16).

## **b) Sténose carotidienne symptomatique**

### **(1) Traitement médical**

Le traitement médical associant la mise en place d'un traitement antiagrégant plaquettaire et la prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaire doit être instauré le plus tôt possible après le diagnostic. Le contrôle strict de la tension artérielle ne doit pas être recherché dans les premiers jours après l'AVC, d'autant plus s'il s'agit d'un accident de cause hémodynamique.

### **(2) Traitement radical**

Le traitement chirurgical doit être réalisé le plus tôt possible (12, 17-19). *Rothwell et al.* (12, 17) ont montré que l'endartériectomie permettait de diminuer de 30% le risque d'AVC à 5 ans, en particulier si la sténose carotidienne était supérieure à 70%. Pour les sténoses comprises entre 50 et 70%, le traitement chirurgical a montré un bénéfice pour les sujets de sexe masculin, pour les patients âgés de plus de 75 ans par rapport à ceux de moins de 65 ans, et si le geste chirurgical est réalisé dans les deux premières semaines après

l'événement neurologique. Le traitement chirurgical par endartériectomie doit être privilégié par rapport à l'angioplastie. L'étude EVA 3S (20) a montré que le risque d'AVC ou de décès à 1 mois était plus important dans le groupe « angioplastie » (9,6%) par rapport au groupe « chirurgie » (4%). Le traitement par angioplastie sera réservé aux patients ayant des contre-indications à la chirurgie, ou ayant une sténose inaccessible ou une sténose radique (16).

### (3) Une particularité : un risque de récurrence précoce élevé

Les patients ayant une sténose carotidienne symptomatique ont un risque élevé de récurrence d'accident ischémique. Ce risque de récurrence est trois fois plus élevé que pour les autres étiologies d'AVC (21). La récurrence est très précoce survenant dans les premiers jours qui suivent le premier événement (22, 23).

Le niveau de risque de récurrence n'est pas uniforme selon les patients. De nombreux facteurs de risque ont été identifiés: l'âge, le sexe masculin, le type d'évènement clinique initial (le risque est plus important s'il s'agit d'un AIC que s'il s'agit d'un AIT ou d'une ischémie rétinienne). Les caractéristiques de la plaque carotidienne sont aussi importantes en particulier le degré de sténose, les contours irréguliers de la plaque à l'imagerie, l'hypoéchogénicité qui sont associés à une augmentation du risque de récurrence (24-26). L'existence d'une mauvaise tolérance hémodynamique augmente également ce risque (27). Récemment, *Marnane et al.* (28) ont montré que l'inflammation de la plaque carotidienne mesurée par tomographie par émission de positons après injection de <sup>18</sup>F-fluorodésoxyglucose (PET FDG) était aussi un facteur de récurrence.

Le facteur prédictif de récurrence précoce le plus puissant, à l'heure actuelle, est la présence de signaux microemboliques (MES) en aval de la sténose carotidienne. Les patients présentant des MES sont à haut risque de récurrence alors que le risque est faible chez les patients sans signaux microemboliques (29-32) (voir chapitre B.5.b.). Cette microembolisation peut être réduite avec une double antiagrégation plaquettaire associant clopidogrel et aspirine (plus efficace que l'aspirine seule). Le fait de faire disparaître ces MES diminuerait le risque de récurrence précoce (33). Les patients ayant des MES sont donc traités par double antiagrégation plaquettaire en attendant l'endartériectomie ou l'angioplastie de la carotide. La présence de MES modifie donc la prise en charge thérapeutique de ces patients.

## **B. Microembolisation cérébrale**

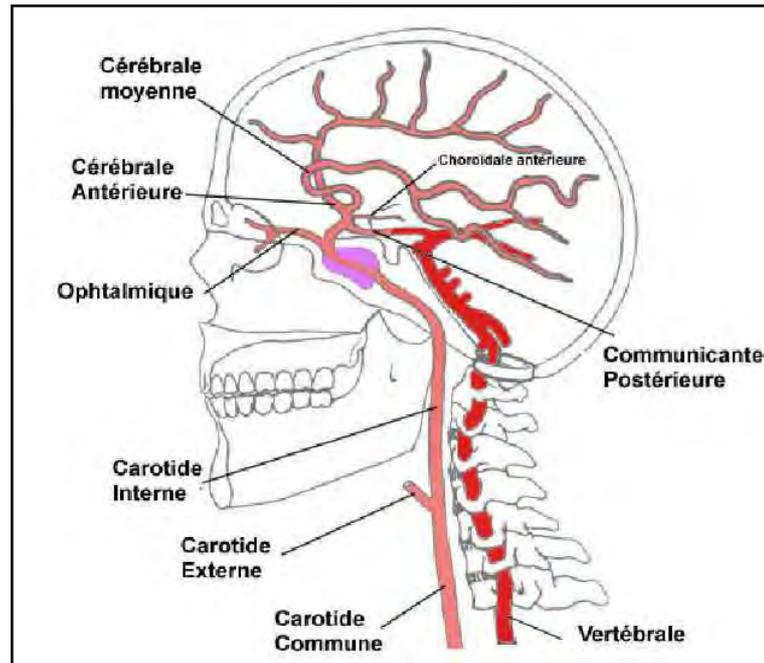
### **1. Généralités**

Les signaux microemboliques (MES) peuvent aussi être appelés HITS (High Intensity Transient Signals) dans la littérature. Nous les appellerons MES dans la suite de l'exposé. *Spencer* (34) a été un des premiers à les décrire en 1990 lors des procédures d'endartériectomie. Il a montré que le doppler transcrânien était une technique très sensible pour détecter les emboles cérébraux qu'ils soient de nature gazeuse ou solide. Dans les sténoses carotidiennes asymptomatiques, ils sont un facteur de risque d'AIT ou d'AIC (35). Dans les sténoses carotidiennes symptomatiques, ils sont le principal facteur de risque de récurrence d'événement vasculaire cérébral (29-32), conduisant à modifier la stratégie thérapeutique initiale (33).

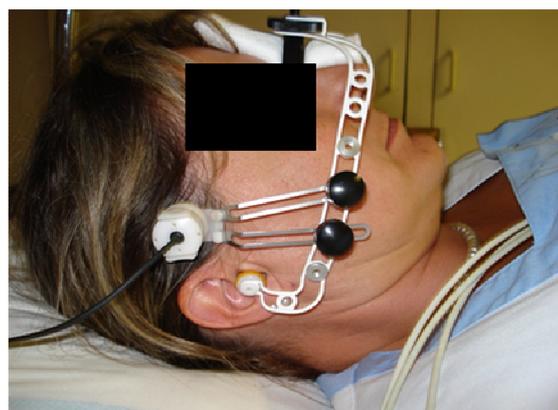
### **2. Diagnostic**

#### **a) Moyens techniques**

Ils sont recherchés en doppler transcrânien (36). On les recherche le plus souvent en regard de l'artère cérébrale moyenne (**Figure 3**). L'absence de fenêtre acoustique temporale (souvent chez la femme âgée) peut empêcher la réalisation de cet examen. Il est également possible de les rechercher au niveau de la circulation postérieure en regard de l'artère cérébrale postérieure (37). L'artère cérébrale moyenne est repérée en utilisant une sonde doppler de 2 MHz et un doppler transcrânien. La profondeur choisie est entre 48 et 58 mm afin d'obtenir un spectre optimal. La sonde doppler est ensuite fixée sur la fenêtre temporale acoustique au moyen d'un dispositif de contention spécifique (**Figure 4**). Le gain est réduit au minimum. Un système d'analyse 64 ou 128 ou 256-point fast Fourier transform (FFT) et un filtre à 100 Hz est utilisé. Le volume d'échantillonnage est entre 4 et 5 mm. La détection des MES est réalisée sur un monitoring doppler continu de 30 minutes à 1 heure. L'augmentation de la durée de l'enregistrement ou la répétition de la procédure augmente la proportion de patients ayant des MES (38). Un opérateur expérimenté écoute et observe le spectre doppler en continu pendant tout le temps du monitoring (**Figure 5**). De façon concomitante, l'examen est enregistré sur un magnétophone pour pouvoir être relu en cas de signal douteux.



**Figure 3 : Représentation schématique de l'anatomie de la vascularisation cérébrale**



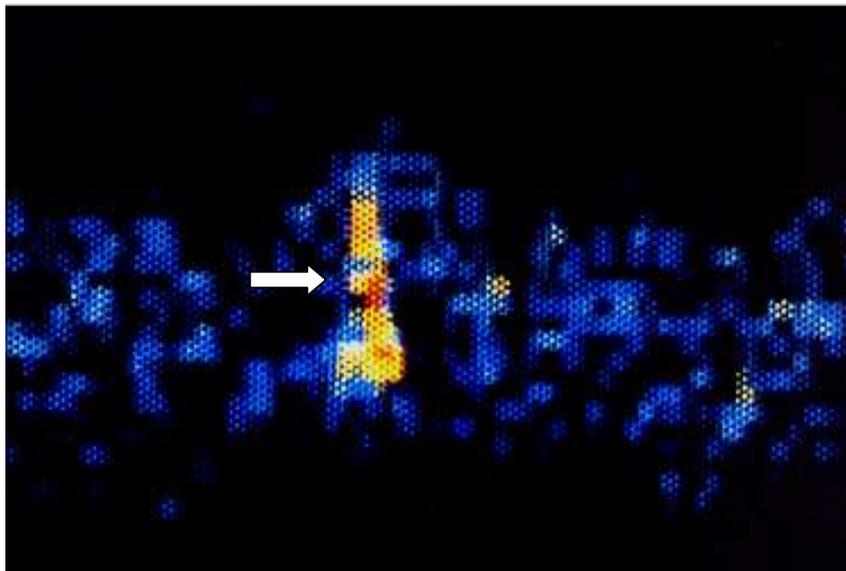
**Figure 4 : Photographie de l'appareil de doppler transcrânien (à gauche) et du dispositif de contention de la sonde doppler sur l'artère cérébrale moyenne (à droite)**

## b) Critères diagnostiques

Les MES sont reconnus comme des signaux (39, 40) (**Figure 5**):

- transitoires (moins de 300 msec),
- de haute intensité (> 3dB),
- unidirectionnels,
- présents dans le spectre doppler,
- survenant au cours de la systole,
- accompagnés d'un bruit caractéristique (comme l'ouverture d'un bouchon de champagne),
- et sans cause possible d'artéfact au même moment.

Les artéfacts sont le plus souvent bidirectionnels et leur intensité est maximale dans les basses fréquences (38).



**Figure 5 : Visualisation d'un signal microembolique au doppler transcrânien**

### c) Méthodes automatisées

Certains auteurs (41-43) ont essayé de développer des modèles automatisés pour faciliter leur recherche mais ces modèles sont moins performants que les systèmes de perception humaine avec une sensibilité allant de 40 à 77% et une spécificité au maximum de 78,5%.

### 3. Situations cliniques associées à la présence de MES

On peut retrouver ces MES dans différentes circonstances (44) (**Tableau 3**). Tout d'abord, ils sont retrouvés à la phase aiguë des AIC ou des AIT. Par ordre de fréquence, ils sont d'abord retrouvés dans les AVC liés à l'athérome des gros troncs artériels puis dans les AVC liés à la fibrillation auriculaire (leur fréquence est faible dans la fibrillation auriculaire). Ils sont absents dans les AVC lacunaires. Ils sont associés à la maladie athéromateuse des gros troncs artériels: les sténoses athéromateuses carotidiennes symptomatiques ou asymptomatiques (39, 45-48), les occlusions carotidiennes, les sténoses de l'artère cérébrale moyenne, les plaques d'athérome aortique. Ils sont également retrouvés dans les dissections carotidiennes. Les MES sont également associés à de nombreuses causes cardioemboliques : la fibrillation auriculaire (49), les valves cardiaques mécaniques ou bioprothèses (49, 50), la phase aiguë d'un infarctus du myocarde, les cardiomyopathies dilatées, la présence d'un thrombus intra-cardiaque, l'endocardite infectieuse, le foramen ovale perméable, les tumeurs cardiaques. Ils sont aussi retrouvés lors des endartériectomies (34), lors des interventions à cœur ouvert (51, 52) ou lors des artériographies (artériographie diagnostique, coronarographie, angioplastie de la carotide). Ils sont parfois associés à certaines maladies de système comme le lupus érythémateux disséminé, le syndrome des anti-phospholipides, la maladie de Behçet, la maladie de Takayasu (44).

**Table. Conditions in Which the Detection of ES Has Been Reported and Those in Which Prospective Data Linking Them to Stroke Risk Are Also Available**

Group	List of Conditions	ES Detected	Prospective Follow-Up Data Reported
Acute stroke/TIA	Acute stroke/TIA	++	++
Large vessel disease			
Extracranial	Symptomatic carotid stenosis	++	++
	Asymptomatic carotid stenosis	++	++
	Carotid occlusion	++	-
	Symptomatic vertebral stenosis	+	-
	Cervical artery dissection	++	+
	Takayasu arteritis	++	+
	Aortic atherosclerosis	++	+
Intracranial	Intracranial stenosis	++	+
	Basilar artery fibromuscular dysplasia	+	-
Carotid intervention	Carotid endarterectomy	++	++
	Carotid stenting	++	++
	Angiography	++	-
Cardioembolic sources	Atrial fibrillation	++	+
	Nonvalvular atrial fibrillation	++	-
	Myocardial infarction	++	+
	Patent foramen ovale	++	-
	Cardiac aneurysm	+	-
	Severe ventricular dysfunction	+	-
	Intracardiac thrombus	+	-
	Dilative cardiomyopathy	+	-
	Left ventricular aneurysm	+	-
	Mechanical/prosthetic heart valves	++	-
	Bacterial endocarditis	+	-
	Native heart valvular disease	++	-
Cardiac interventions	Pulmonary vein antrum isolation	++	-
	Cardiac catheterization	+	-
	Cardiopulmonary bypass	++	-
	Coronary artery bypass grafting	++	-
	Aortic valve replacement	++	-
	Transcatheter closure of patent foramen ovale	++	-
Subarachnoid hemorrhage	Aneurysmal subarachnoid hemorrhage	+	-
Prothrombotic states	Systemic lupus erythematosus	+	-
	Polycythemia rubra vera	+	-
Orthopaedic	Fat embolism after long-bone fracture	+	-
	Hip arthroplasty	+	-

++ indicates data from >1 study; +, data from 1 study; -, no data reported.

**Tableau 3 : Différentes situations cliniques associées à la présence de MES (44)**

#### 4. A quoi correspondent ces MES en réalité?

L'étude doppler permet seulement de différencier les particules gazeuses des particules solides (53, 54) et d'évaluer leur taille. Dans deux études expérimentales (55, 56), des emboles de différentes natures (thrombus, agrégats plaquettaires, matériel athéromateux, graisse, air) ont été injectés soit dans la carotide interne d'un mouton (55) soit dans l'aorte d'un lapin (56) et les signaux recueillis au doppler ont été analysés. Ces deux équipes ont montré qu'il existait une corrélation entre la taille de l'embole et l'intensité et la durée du signal. Une autre étude de *Markus et al.* (57) a analysé les signaux doppler après passage d'emboles de différentes natures dans un système de flux *in vitro*. Cette étude a montré une corrélation entre la taille de l'embole et l'amplitude maximale atteinte ainsi que la durée de l'amplitude maximale atteinte. Pour un embole de même taille constitué soit de matériel athéromateux soit d'agrégats plaquettaires, l'amplitude maximale atteinte au doppler n'est pas la même. L'amplitude maximale est plus importante pour le matériel athéromateux que pour les agrégats plaquettaires. Il est cependant très difficile de faire la différence entre un embole athéromateux de petite taille et un agrégat plaquettaire de taille importante. A l'heure actuelle, il n'est donc pas possible de différencier la nature exacte des emboles solides à l'aide du doppler transcrânien.

Il est possible que la nature des MES varie en fonction de leur origine. Les MES présents chez les porteurs de valve seraient d'origine gazeuse car le signal doppler est très intense, il n'y a pas d'événements cliniques associés et leur prévalence n'est pas diminuée par le traitement anticoagulant (49, 58, 59). Les MES liés à la fibrillation auriculaire seraient plutôt d'origine thrombotique car sensibles à la prise d'anticoagulant (60). Nous supposons aussi que les MES présents chez les patients porteurs d'une sténose athéromateuse de la carotide seraient constitués soit d'agrégats plaquettaires ou d'agrégats leuco-plaquettaires car leur prévalence est diminuée par le traitement antiagrégant plaquettaire.

#### 5. Cas particulier des sténoses athéromateuses de la carotide

##### a) **Sténose carotidienne asymptomatique**

Chez les patients porteurs d'une sténose carotidienne asymptomatique, les MES sont retrouvés dans environ 10% des cas (15, 61). Leur présence est un facteur de risque d'AIT ou d'AVC (35). Dans l'étude de *Markus et al.* (15) portant sur 467 patients ayant une sténose

asymptomatique, le risque d'avoir un AIT ou un AIC dans les 2 ans est multiplié par 2,54 en présence de MES.

### **b) Sténose carotidienne symptomatique**

Chez les patients porteurs de sténose carotidienne symptomatique, les MES sont retrouvés dans environ 40% des cas (61) (plus fréquemment que pour les sténoses asymptomatiques). Leur présence et leur nombre sont inversement proportionnels au temps écoulé depuis la survenue des symptômes (42, 47, 62, 63). Ils sont le plus souvent détectés dans les premières heures après l'événement neurovasculaire mais ils peuvent être retrouvés plusieurs jours ou semaines après les symptômes (64). Ils sont le principal facteur de risque de récurrence d'événement vasculaire cérébral (29, 31, 32, 65, 66). Une revue de la littérature (61) montre que le risque d'AVC et/ou d'AIT est de 1,3% par jour si le patient présente des MES contre 0,3% si le patient n'a pas de MES. Dans l'étude de Markus et al. (29), la présence de MES multiplie par 4,7 le risque de récurrence d'AIT ou d'AIC indépendamment des facteurs de risques cardiovasculaire, du degré de la sténose carotidienne, et du délai après le premier événement. Les MES ont donc une valeur discriminante vis-à-vis du risque de récurrence précoce. Le risque est très élevé en présence de MES alors qu'il est très faible, presque nul, en leur absence.

### **c) Diminution des MES par un traitement antiagrégant plaquettaire**

Dans les sténoses de la carotide, la prévalence des MES peut être diminuée ou disparaître par la mise en place d'un traitement antiagrégant plaquettaire. Les MES sont diminués voir disparaissent dans les 30 minutes après l'administration de 500 mg d'aspirine en intraveineux (67). D'autres antiagrégants plaquettaires comme le clopidogrel, la ticlodipine (66) ou le tirofiban (inhibiteur du récepteur GpIIbIIIa) (68) diminueraient la microembolisation cérébrale. Une double anti-agrégation par aspirine et clopidogrel semble être plus efficace qu'une simple anti-agrégation par aspirine seule (33, 69). L'étude CARESS (33) montre une diminution de 40% des MES sous double anti-agrégation plaquettaire par rapport au traitement par aspirine seule. Le traitement anticoagulant ne semble pas influencer la microembolisation cérébrale dans cette étiologie (61, 66).

Dans notre service, nous utilisons une double antiagrégation plaquettaire lorsque des MES sont trouvés chez les patients ayant fait un AIT ou un AIC en rapport avec une sténose carotidienne car le rapport bénéfice/risque de ce traitement en présence de MES semble favorable (33), ce qui conforte l'idée que les MES sont un facteur de causalité de récurrence et pas un simple facteur corrélatif. Dans les centres qui ne réalisent pas la recherche de MES, la majorité des patients sont traités par une simple antiagrégation plaquettaire, ce qui peut être une perte de chance pour les patients qui auraient présenté des MES.

#### **d) Corrélation avec les caractéristiques morphologiques de la plaque carotidienne**

Dans les sténoses carotidiennes, les MES sont corrélés à différentes caractéristiques morphologiques de la plaque carotidienne. Tout d'abord, les MES sont corrélés au degré de sténose : les MES sont plus souvent associés aux sténoses supérieures à 70% par rapport aux sténoses comprises entre 50 et 70% (31, 48, 63, 70). Les MES sont également associés au caractère hypoéchogène de la plaque évalué au doppler transcrânien (71). Certains auteurs ont montré qu'ils étaient aussi corrélés à l'irrégularité et l'hétérogénéité de la plaque à l'analyse anatomopathologique (72) et à l'ulcération de la plaque visible à l'angiographie (31, 73, 74), également visible macroscopiquement lors de l'endartériectomie (75) ou lors de l'étude anatomopathologique (76). La présence d'un thrombus intraluminal macroscopiquement visible lors de l'endartériectomie (75, 77) ou lors de l'analyse histologique (76) est également associée à la présence de MES. D'autres caractéristiques morphologiques comme la néovascularisation de la plaque carotidienne (78) et l'existence d'une hémorragie intra-plaque (75, 77) sont corrélées à la microembolisation cérébrale.

#### **e) Corrélation avec le caractère inflammatoire de la plaque carotidienne**

L'étude de *Moustafa et al.* (la première étude portant sur 16 patients (79)) a montré une corrélation entre la présence de MES et l'inflammation de la plaque carotidienne mesurée par tomographie par émission de positons après injection de <sup>18</sup>F-fluorodésoxyglucose (PET FDG) (80). L'étude récente de *Marnane et al.* (28) portant sur 60 patients confirme cette association.

## **f) Corrélation avec des marqueurs d'inflammation systémique**

Certains auteurs ont montré également que la présence de MES était corrélée à un certain degré d'inflammation systémique. *Aronow et al.* (81) ont été les premiers à étudier la corrélation entre la microembolisation cérébrale et le taux de globules blancs dans le sang. Leur étude a inclus 43 patients bénéficiant d'une angioplastie de la carotide pour une sténose carotidienne asymptomatique ou symptomatique. Le taux de leucocytes et particulièrement le taux de polynucléaires neutrophiles (PNN) dans le sang avant la procédure était corrélé à la présence et au nombre de MES pendant l'angioplastie de la carotide. *Nasr et al.* (82) ont inclus 60 patients ayant une sténose symptomatique de la carotide et ont montré que les MES étaient corrélés au taux de PNN ( $p= 0,002$ ). Ils n'ont pas retrouvé d'association entre la présence de MES et le taux de monocytes, de lymphocytes ou de protéine C réactive (CRP). On peut penser que les PNN activés interagissent avec les plaquettes et forment des agrégats PNN-plaquettes. Les MES pourraient être constitués d'agrégats PNN-plaquettes.

## **g) Les MES sont-ils des agrégats leuco-plaquettaires ? (Annexe 1)**

L'étude de *Mc Cabe et al.* (83) montre une augmentation des agrégats PNN-plaquettes et monocytes-plaquettes chez les patients ayant une sténose symptomatique de la carotide (dans les 3 premières semaines) par rapport aux patients ayant une sténose asymptomatique. Les auteurs suggèrent que le risque de récurrence précoce d'événement cérébrovasculaire d'une sténose symptomatique de la carotide pourrait être lié aux agrégats leucocytes-plaquettes. *Ritter et al.* (61) ont étudié la corrélation entre les agrégats leuco-plaquettaires et les MES chez 30 patients ayant une sténose asymptomatique de la carotide et chez 16 patients ayant une sténose de la carotide symptomatique depuis moins de 4 jours. Cette étude n'a pas permis de montrer une différence significative du taux d'agrégats PNN-plaquettes ou monocytes-plaquettes dans le sang périphérique chez des patients avec une sténose carotidienne, selon qu'ils présentaient ou non des MES. Cependant, cette étude incluait peu de patients et des patients à la fois symptomatiques et asymptomatiques. Celle-ci a par contre permis de montrer une augmentation des marqueurs d'activation plaquettaire circulants comme la P-sélectine soluble chez les patients avec MES par rapport à ceux sans MES. Les plaquettes et surtout l'activation plaquettaire pourrait donc jouer un rôle central

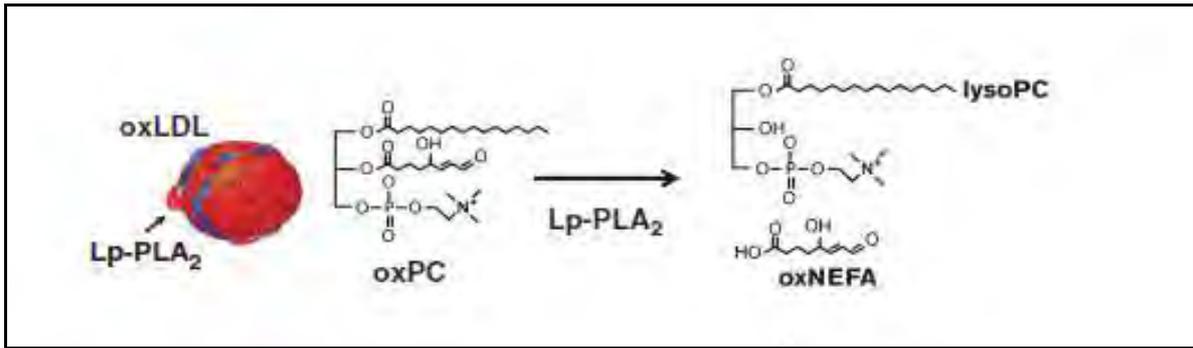
dans la microembolisation cérébrale. Il serait intéressant d'étudier quelles voies d'activation plaquettaire sont mises en jeu (Annexe 2). La voie d'activation mettant en jeu le récepteur du collagène GPVI semble particulièrement intéressante. En effet, le récepteur GPVI jouerait un rôle dans la formation du thrombus et également dans la formation des agrégats monocytes-plaquettes au niveau de la plaque d'athérome (84).

## C. La lipoprotéine associée à la phospholipase A2

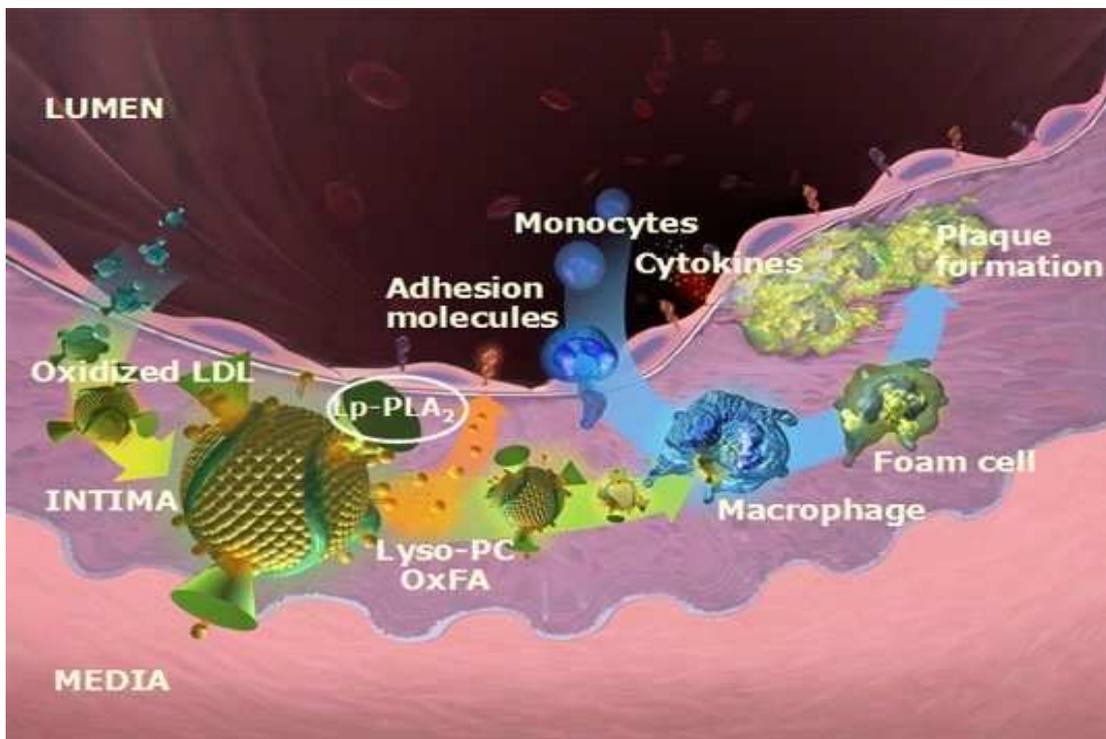
Plusieurs études rapportent l'intérêt de la lipoprotéine associée à la phospholipase A2 (Lp-PLA2), comme marqueur de risque vasculaire (85-95).

### 1. Lp-PLA2 : au croisement du métabolisme lipidique et de la réponse inflammatoire

La Lp-PLA2 fait partie de la superfamille des phospholipases A2, enzymes qui hydrolysent les phospholipides (96). Elle est produite par les cellules inflammatoires circulantes et de la paroi intinale (97). La PLA2 se lie à l'apolipoprotéine B-100 (apoB-100) contenue dans les lipoprotéines : lipoprotéine de basse densité (LDL), lipoparticule (a) (Lp(a)), lipoprotéine de haute densité (HDL), et autres. La majorité de la PLA2 se lie aux particules de LDL circulantes (98). La PLA2 va hydrolyser les phospholipides oxydés dans les particules de LDL pour produire la lysophosphatidylcholine (lysoPC) et des acides gras non estérifiés (NEFA) (99) (**Figure 6**). La lysoPC et les NEFA sont des médiateurs de l'inflammation en entraînant l'expression de molécules d'adhésion, en activant les leucocytes et en recrutant les macrophages et les monocytes dans la plaque d'athérome, (99, 100) (**Figure 7**). Ainsi, les cellules inflammatoires recrutées dans la plaque d'athérome vont produire encore plus de Lp-PLA2, ce qui va constituer une boucle d'amplification contribuant à la progression de l'athérome (99).



**Figure 6 : Mode d'action de la lipoprotéine associée à la phospholipase A2**



**Figure 7 : Implication de la lipoprotéine associée à la phospholipase A2 dans la progression de la plaque d'athérome**

## 2. La Lp-PLA2 : marqueur d'instabilité de la plaque

La Lp-PLA2 a un rôle dans la progression de l'athérosclérose. *Hakkinen et al. (97)* ont démontré par des techniques d'hybridation in situ et par immunohistochimie la présence de transcrits d'ARN messenger de Lp-PLA2 dans les plaques d'athérome humaines riches en macrophages, suggérant que la Lp-PLA2 était synthétisée localement par les macrophages.

*Kolodgie et al.* (101) ont étudié l'expression de la Lp-PLA2 dans les artères coronaires de 25 sujets décédés d'une mort subite d'origine cardiaque. Les échantillons comportant une plaque avec chape fibreuse fine ou une rupture de plaque montraient un taux élevé de Lp-PLA2 par comparaison aux plaques stables. L'expression de la Lp-PLA2 était plus importante au niveau du noyau nécrotique ou au contact des macrophages. La Lp-PLA2 a également été retrouvée dans les plaques d'athérome carotidien. *Mannheim et al.* (102) ont étudié l'expression de la Lp-PLA2 sur 167 échantillons de plaque carotidienne de patients ayant eu une endartériectomie. Les échantillons provenant des patients symptomatiques (ayant eu un AIT ou un AIC homolatéral à la sténose carotidienne) avaient une expression plus élevée de Lp-PLA2 et de lysoPC par rapport aux échantillons provenant des patients asymptomatiques. Ces études suggèrent que la Lp-PLA2 pourrait être corrélée à l'instabilité de la plaque d'athérome (coronaire ou carotidienne).

### 3. Lp-PLA2 : facteur de risque indépendant d'événements vasculaires

#### **a) Maladie coronaire**

La « West of Scotland Coronary Prévention Study » (103) est la première étude à montrer que la Lp-PLA2 est un facteur de risque indépendant de maladie cardiovasculaire. L'élévation de la Lp-PLA2 est associée à la survenue d'un événement cardiovasculaire (RR 1,2, IC 1,08-1,34,  $p < 0,001$ ). Même après ajustement sur les traditionnels facteurs de risques cardiovasculaires ou pour les autres marqueurs inflammatoires, la relation reste significative (RR 1,18, IC 1,05-1,33,  $p < 0,005$ ). La majorité des études évaluant la relation entre la Lp-PLA2 et la survenue d'un événement coronarien chez des patients sans antécédents de maladie cardiovasculaire ont montré une association (104). De nombreuses études ont montré une corrélation entre le niveau de Lp-PLA2 et les facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels comme l'âge (105, 106), le taux de cholestérol total (105), le taux de LDL cholestérol (85, 105-108), le taux de HDL cholestérol (85, 106, 108), le taux de triglycérides (106), l'obésité (106), le syndrome métabolique (86). Après ajustement sur ces facteurs de risque, l'élévation de la Lp-PLA2 était toujours associée à la survenue d'un événement cardiovasculaire.

## **b) Accidents vasculaires cérébraux**

Plusieurs études ont montré que la Lp-PLA2 est un facteur de risque indépendant d'AIC (85-87) ou d'AIT (87, 88). Dans l'étude de Rotterdam (87), une étude prospective incluant 7983 hommes et femmes de plus de 55ans, 110 cas d'AVC ont été identifiés. Le risque d'AVC augmente avec chaque augmentation de quartile de Lp-PLA2. Après ajustement sur les facteurs de risque cardio-vasculaire traditionnels, l'odds ratio pour le 2<sup>ème</sup>, le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> quartile de Lp-PLA2 est respectivement de 1,08, 1,58 et 1,97 (p= 0,03).

### 4. Lp-PLA2 : facteur de risque de récurrence d'événements vasculaires

#### **a) Maladie coronaire**

*Sabatine et al.* (89) ont étudié l'association entre le niveau de la Lp-PLA2 chez des patients ayant une maladie coronaire connue et la survenue d'un événement cardiovasculaire incluant la mort cardiovasculaire, l'infarctus du myocarde, la nécessité d'une revascularisation coronaire, l'hospitalisation pour un angor instable et la survenue d'un AVC. Une augmentation graduelle de la survenue d'un événement cardiovasculaire était observée avec l'augmentation de la Lp-PLA2 avec un odds ratio de 1,41 (IC 1,17-1,70, p< 0,001) dans le 4<sup>ème</sup> quartile par rapport au 1<sup>er</sup> quartile de Lp-PLA2 (dans un modèle ajusté pour les facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels). L'étude de *Robins et al.* (90) suggère aussi l'hypothèse que la Lp-PLA2 pourrait être utilisée pour stratifier le risque des patients ayant une coronaropathie stable.

*Gerber et al.* (91) ont évalué le niveau de Lp-PLA2 mesuré au moment de l'infarctus du myocarde et ont montré une augmentation de la mortalité dans les groupes des tertiles supérieur et moyen de Lp-PLA2 comparés au premier tertile avec des odds ratios de 2.15 et 5.35 (p< 0,001) après ajustement pour les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels. L'étude THROMBO (92) a aussi mis en évidence un doublement du risque de récurrence en post IDM chez les patients dans le quart supérieur du dosage de Lp-PLA2.

## **b) Accidents vasculaires cérébraux**

La Lp-PLA2 paraît prédire le risque de récurrence d'AVC indépendamment des FDR CV traditionnels. L'étude de *Elkind et al.* (93) a dosé le taux de Lp-PLA2 chez 467 patients hospitalisés pour un premier événement ischémique cérébrovasculaire. Après un suivi médian de 4 ans, 80 patients ont présenté une récurrence d'AVC. Le quartile de Lp-PLA2 le plus élevé était associé à une augmentation du risque de récurrence d'AVC comparé au quartile le plus bas (OR= 2,09, IC : 1,07-4,08). L'étude de *Hermann et al.* (94) montre qu'un niveau élevé de Lp-PLA2 chez des patients venant de subir une endartériectomie est associé à un risque plus important d'événement cardiaque avec un odds ratio de 3,39 (IC 1,13-10,17).

Pour consolider ces données, une méta-analyse (95) portant sur 79 036 participants venant de 32 études prospectives a été réalisée par « the Lp-PLA2 Studies Collaboration group ». Pour chaque augmentation d'une déviation standard de Lp-PLA2, le risque relatif d'avoir un événement coronaire était respectivement augmenté pour l'activité enzymatique et pour la masse de 1,10 (1,05-1,16) et de 1,11 (1,07-1,16) de la Lp-PLA2. Le risque relatif d'AVC était de 1,08 (0,97-1,20) et de 1,14 (1,02-1,27). Pour la mort vasculaire, le risque relatif était de 1,16 (1,09-1,24) et de 1,13 (1,05-1,22).

## **5. Stabilité du dosage de la Lp-PLA2**

Il a été démontré que la Lp-PLA2 avait un niveau constant chez le même individu (109). Son taux ne varie pas en cas de manifestations inflammatoires ou infectieuses systémiques, contrairement au dosage de la CRP ou aux taux de PNN. Elle peut être un marqueur plus spécifique de l'inflammation vasculaire.

Actuellement, le dosage de la Lp-PLA2 peut être réalisé de deux façons : soit en mesurant la masse soit en mesurant l'activité enzymatique. La corrélation entre les deux techniques n'est pas parfaite (107, 110). La mesure de l'activité enzymatique semble être plus sensible pour évaluer le risque de récurrence d'un événement neurovasculaire (93, 111,134).

## **D. But de l'étude**

Dans notre équipe, nous utilisons les MES dans la prise en charge des patients à la phase aiguë des sténoses carotidiennes symptomatiques. Leur présence nous permet de déterminer les patients les plus à risque de récurrence précoce et nous conduit à modifier notre stratégie thérapeutique en mettant en place une double antiagrégation plaquettaire. La présence de MES est le meilleur marqueur actuel du risque de récurrence précoce chez ces patients. Mais, la technique de recherche de MES est coûteuse en temps et nécessite un ou plusieurs opérateurs expérimentés, d'ailleurs actuellement très peu d'équipes en France et en Europe l'utilisent.

Un marqueur plasmatique fortement corrélé à la présence de MES pourrait permettre de remplacer cet examen dans notre service car il serait beaucoup plus simple d'identifier les patients à risque et, à terme, pourrait être appliqué facilement dans les autres centres.

L'objectif principal de notre étude est de rechercher une corrélation entre le taux de Lp-PLA2 et la présence de MES. Si cette corrélation existait, le dosage de la Lp-PLA2 pourrait remplacer la recherche de MES. Ainsi, les patients ayant une sténose symptomatique de la carotide à risque de récurrence précoce pourraient rapidement bénéficier d'une double antiagrégation plaquettaire dans l'attente de l'endartériectomie ou de l'angioplastie de la carotide.

L'objectif secondaire de notre étude est d'appréhender la physiopathologie des MES. Si nous pouvions avancer sur la connaissance de la composition de ces micro-emboles, nous pourrions faire un premier pas utile à la recherche de nouveau traitement. Nous allons rechercher s'il existe une association entre les MES et les agrégats leuco-plaquettaire (monocytes-plaquettes et PNN-plaquettes) chez les patients ayant une sténose carotidienne symptomatique. Nous allons également rechercher si une voie d'activation plaquettaire est privilégiée chez les patients présentant des MES en analysant les voies de signalisation activées en aval des récepteurs couplés aux protéines G (voie de l'ADP ou de la thrombine) ou celles activées via les tyrosines kinases (voie du récepteur du collagène GPVI notamment). Si une voie d'activation était privilégiée, nous pourrions espérer développer à la fois un marqueur moléculaire et potentiellement une stratégie thérapeutique en inhibant préférentiellement la voie concernée.

## **II. Matériels et Méthodes**

### **A. Cadre du protocole**

Ce projet est une étude prospective monocentrique (Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse) qui s'est déroulé sous la responsabilité du Pr Vincent Larrue, du Dr Françoise Maupas-Schwalm et du Pr Bernard Payrastre.

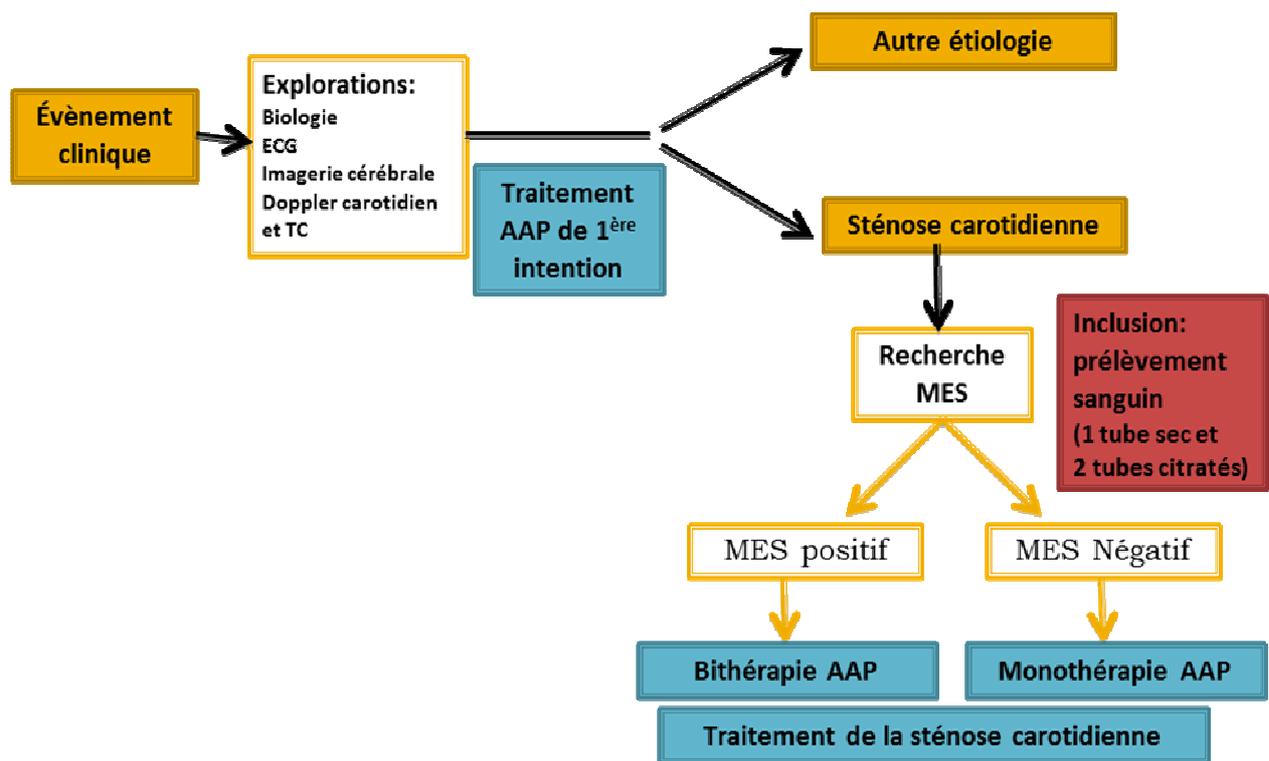
Plusieurs services ont participé à ce projet :

- l'équipe du service de neurosonologie du Pr Vincent Larrue : le Dr Brigitte Guidolin, le Dr Nathalie Nasr, Nathalie Aragon, Valérie Bezombes, Hélène Pillon et Dominique Roques,
- les services de neurologie vasculaire du Pr Vincent Larrue avec le Dr Alain Viguié et le Dr Lionel Calvière et du Pr François Chollet avec le Dr Blandine Acket et le Dr Virginie Sattler et l'ensemble des équipes soignantes,
- le service de biochimie de l'hôpital Rangueil avec l'ensemble des techniciens et particulièrement le Dr Jean Marie Botella et le Dr Françoise Maupas-Schwalm,
- le service d'Hématologie/Hémostase du Pr Sié en particulier l'UF d'Hémostase Cardio-Vasculaire (Pr Payrastre) avec Cédric Garcia (ingénieur-technicien) et le Dr Sophie Voisin,
- l'équipe 11 de l'unité INSERM 1048 dirigée par le Pr Bernard Payrastre et avec la collaboration de nombreux chercheurs parmi lesquels Marie-Pierre Gratacap, Jean Marie Xuereb, Pauline le Faouder, Claire Cénac.

Le comité d'éthique de la recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse dirigé par le Dr JM. Conil a validé la réalisation du protocole (avis favorable, n°15-0511) (Annexe 6).

Les patients inclus ont été hospitalisés dans le service de Neurologie vasculaire du Pr Larrue ou dans le service de Neurologie vasculaire du Pr Chollet pour la prise en charge d'un

AIT, d'un AIC ou d'une ischémie rétinienne. Dans le cadre du bilan systématique d'un événement vasculaire neurologique, ils ont bénéficié d'un bilan biologique complet comprenant un bilan lipidique et une HbA1C, d'un électrocardiogramme (ECG), d'une imagerie cérébrale de préférence une IRM cérébrale avec un examen angiographique et d'un échographie-doppler carotidien et transcârien. Si l'AIT ou AIC était en rapport avec une sténose de la carotide, les patients ont été traités par une monothérapie anti-agrégante plaquettaire, parfois associée à une anticoagulation curative (surtout s'il existait un thrombus sur plaque) et une recherche de MES a été réalisée. C'est au moment de la recherche de MES que les patients ont été prélevés (1 tube sec et 2 tubes citratés) pour la réalisation de l'ensemble des analyses de notre étude. Si la recherche de MES était positive, une double anti-agrégation plaquettaire était mise en place en attendant l'endartériectomie ou l'angioplastie de la carotide. En cas de recherche négative, le traitement n'était pas modifié (**Figure 8**).



**Figure 8 : Protocole expérimental de l'étude**

## **B. Population de l'étude**

### **1. Patients**

Les patients, explorés dans le service de Neurologie Vasculaire, Hôpital Rangueil, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, ont été inclus de façon prospective de décembre 2011 à février 2013. Ils ont tous bénéficié d'une échographie-doppler carotidien et transcrânien et d'une recherche de signaux microemboliques sur l'artère cérébrale moyenne (ACM) en aval de la sténose carotidienne symptomatique.

Les patients majeurs des 2 sexes étaient inclus si :

- ils avaient présenté un accident ischémique constitué ou un accident ischémique transitoire ou une cécité monoculaire,
- datant de moins de 60 jours,
- en rapport avec une sténose athéromateuse supérieure ou égale à 50% de la carotide interne extra-crânienne.
- ils ne présentaient pas d'autre cause potentielle d'AIC ou d'AIT.
- ils avaient consenti de façon libre et éclairée à la réalisation de cette étude (Annexe 4 et 5).

Les patients présentant une des caractéristiques suivantes étaient exclus de l'étude :

- absence de/ou mauvaise fenêtre temporale acoustique,
- présence d'une cause cardiaque pouvant être à l'origine de MES (valve cardiaque prothétique ou fibrillation auriculaire),
- occlusion ou sténose de l'ACM homolatérale à la sténose de la carotide interne extracrânienne,
- traitement par clopidogrel au moment de l'inclusion.

Les informations suivantes ont été collectées:

- âge,
- sexe,
- poids, taille, indice de masse corporelle (IMC),
- les facteurs de risque cardiovasculaires (diabète, hypertension artérielle (HTA), tabagisme actif ou sévère depuis moins de 3 ans, ATCD familiaux cardiovasculaires précoces),
- le diagnostic (AIT, AIC ou ischémie rétinienne),
- le délai entre les symptômes et l'inclusion dans l'étude,
- la sévérité de l'AVC à l'admission par le calcul du score NIHSS (112) (Annexe 3),
- l'utilisation et le type d'antiagrégant plaquettaire ou de traitement anticoagulant,
- la présence d'un traitement par statines,
- le degré de sténose carotidienne évalué par échographie-doppler,
- l'aspect échographique de la sténose (échogénicité, aspect irrégulier, présence d'un thrombus),
- la concentration des marqueurs d'inflammation systémique (GB, PNN, monocytes, CRP),
- La concentration des marqueurs lipidiques (LDL cholestérol et lipoparticule (a)),
- la valeur de l'HbA1C,
- la valeur du dosage de l'activité enzymatique de la Lp-PLA2 dans le plasma,
- le pourcentage d'agrégats monocytes-plaquettes et PNN-plaquettes dans le plasma,
- le niveau de protéines plaquettaires phosphorylées AKT, P38 et SLP76 dans le plasma,
- l'évolution à 1 mois (survenue d'une récurrence d'AIT ou AIC ou autre complication).

## 2. Témoins

Nous avons inclus un groupe témoin de sujets non malades pour l'analyse des agrégats leuco-plaquettaires et de la signalisation plaquettaire. En effet, il s'agit d'études expérimentales et nous ne disposons pas de valeurs de référence.

Les critères d'inclusion des témoins étaient :

- absence de facteurs de risque cardio-vasculaires,
- absence de maladie cardio-vasculaire ou maladie inflammatoire chronique connue,
- absence de traitement antiagrégant plaquettaire,
- consentement libre et éclairé à la réalisation de cette étude.

Pour l'étude de la Lp-PLA2, nous disposons des valeurs de sujets témoins fournies par le laboratoire Eurobio représentant la société diaDexus Inc.<sup>®</sup>. Elles ont été obtenues à partir de 115 sujets français masculins et féminins âgés de 40 à 70 ans. Une valeur supérieure ou égale à 195 nmol/min/mL dans une population d'hommes et femmes ayant présenté un AIT ou un AIC représente la valeur du tertile supérieur (correspondant au 67<sup>ème</sup> percentile) au-delà de laquelle le patient présente un risque accru de récurrence d'accident vasculaire. C'est cette valeur qui nous servira de référence dans notre étude.

## **C. Etude doppler**

### 1. Sténose carotidienne

Le degré de sténose carotidienne a été quantifié grâce à l'échographie-doppler (Philips IU22), en se basant sur la conférence de consensus de la société des radiologues en échographie (5). Selon ces critères, une sténose carotidienne supérieure ou égale à 50% était diagnostiquée si le pic de vitesse systolique était supérieur ou égal à 125cm/s, la vitesse en fin de diastole supérieure ou égale à 40 cm/s, et le ratio systolique supérieur ou égal à 2. Tous les patients avaient aussi un examen d'angiographie (angioTDM ou ARM) pour confirmer le degré de sténose. Selon l'intensité du signal de la plaque carotidienne, les plaques ont été décrites soit à prédominance hypoéchogène soit à prédominance hyperéchogène. Les plaques à prédominance hypoéchogène ont un signal hypointense à l'échographie et sont associées à une composante lipidique importante et à une possible hémorragie intra-plaque. Les plaques à

prédominance hyperéchogène ont un signal hyperintense à l'échographie et sont associées à une composante calcique importante (8).

## 2. Recherche de MES

L'artère cérébrale moyenne du côté homolatéral à la sténose carotidienne était repérée en utilisant une sonde doppler de 2 MHz et un doppler transcrânien (DWL Multidop). La profondeur choisie était entre 45 et 60 mm afin d'obtenir un spectre optimal. La sonde doppler était ensuite fixée sur la fenêtre temporale acoustique au moyen d'un dispositif de contention spécifique. Le gain était réduit au minimum. La détection des MES était réalisée sur un monitoring doppler continu sur 30 minutes. Une transformée de Fourier en 128 points et un filtre à 100 Hz a été utilisé. Le volume d'échantillonnage était fixé entre 5 et 8 mm. Un opérateur expérimenté écoutait et observait le spectre doppler en continu pendant tout le temps du monitoring. De façon concomitante, chaque examen était enregistré sur un magnétophone (Tascam). Les MES étaient diagnostiqués en utilisant les critères publiés précédemment (33). Si un signal était douteux, l'enregistrement était revu par un autre opérateur expérimenté. Les résultats des différentes analyses plasmatiques n'étaient pas connus des 2 opérateurs expérimentés. Les patients ont été répartis en 2 groupes : 1 groupe MES- (0 MES) et un groupe MES+ (supérieur ou égal à 1 MES).

### **D. Echantillons sanguins**

Les échantillons sanguins des patients ont été prélevés au niveau d'une veine périphérique de l'avant-bras, dans les 60 jours après l'événement neurologique, le même jour que la recherche de MES, sur 1 tube sec et 2 tubes anticoagulés avec du citrate de sodium. Les échantillons de sang veineux des patients prélevés sur tube sec (pour le dosage de la Lp-PLA2) ont été centrifugés à 3500 rpm pendant 15 minutes dans les 2 heures suivant le prélèvement. Le sérum a été prélevé et distribué dans des cryotubes congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ces échantillons ont pu être conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à 9 mois après le prélèvement, la stabilité à long terme de la Lp-PLA2 ayant été démontrée dans des échantillons congelés (87). Pour minimiser la potentielle activation cellulaire dû au prélèvement, les échantillons sanguins sur tube citraté (pour l'analyse des agrégats leuco-plaquettaires et de la signalisation plaquettaire) de tous les participants (patients et témoins) ont été laissés 1 heure au repos après le prélèvement.

## 1. Lp-PLA2

Un dosage de l'activité enzymatique de la Lp-PLA2 a été effectué sur un automate OLYMPUS AV 2700 (Coulter Beckman<sup>®</sup>) avec un kit de dosage spécifique PLAC Test<sup>®</sup> de la société Eurobio France représentant la société diaDexus Inc.<sup>®</sup>. Le principe de dosage réalisé est le suivant (111): la Lp-PLA2 présente dans le sérum hydrolyse en position sn-2 le substrat 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine et produit du 4-nitrophénol dont le taux détecté par spectrophotométrie est corrélé à l'activité de la Lp-PLA2.

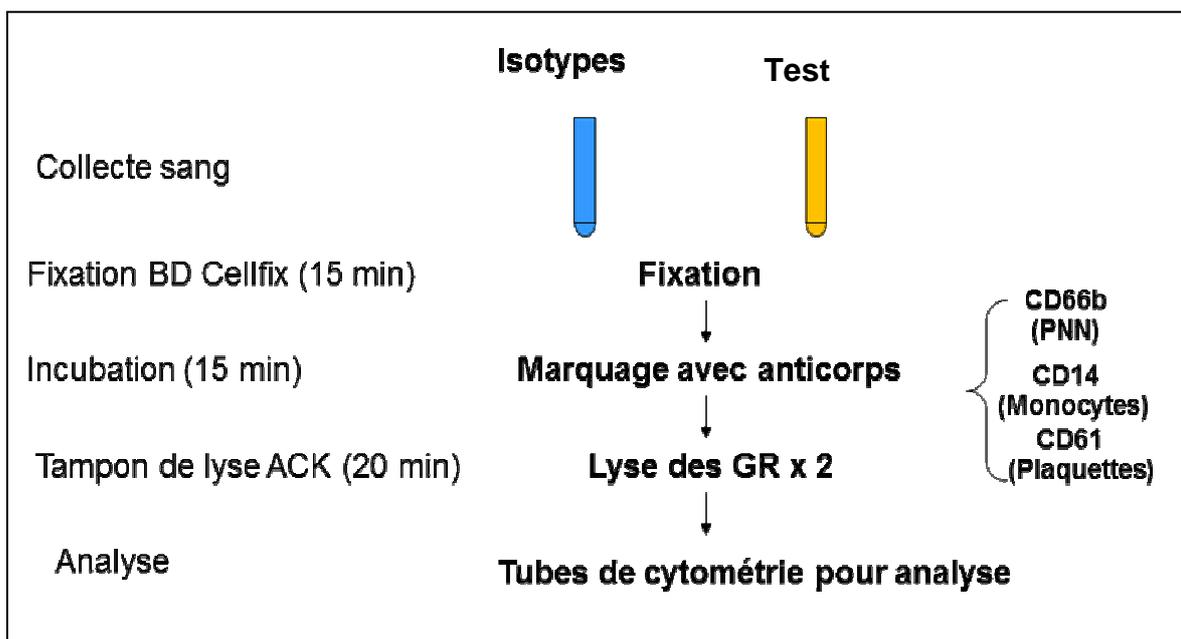
Après décongélation à 4°C, les échantillons de sérum des patients ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 5 minutes et le dosage sanguin a été réalisé. Un jeu de cinq calibreurs de Lp-PLA2 est utilisé pour tracer une courbe de concordance d'absorbance standard. L'activité de la Lp-PLA2 (exprimée en nmol/min/ml) présente dans l'échantillon est obtenue en comparant la valeur de l'absorbance observée à cette courbe de concordance d'absorbance standard. Toutes les mesures ont été réalisées dans le service de Biochimie de l'hôpital de Toulouse-Rangueil. Les analyses étaient effectuées par un biochimiste qui n'avait pas connaissance des données cliniques des patients.

## 2. Agrégats leuco-plaquettaires

Les agrégats monocytes-plaquettes et PNN-plaquettes ont été étudiés chez les témoins et les patients par une technique de cytométrie de flux. Deux tubes ont été préparés: 1 tube « isotypique » et 1 tube « test ». Dans chaque tube, 100 µl de sang total ont été déposés. Ensuite, les cellules ont été fixées avec 500 µl de fixateur commercial (Becton Dickinson<sup>®</sup> Cellfix) pendant 15 minutes à température ambiante. 2 ml de tampon PBS (Phosphate buffered saline) (NaCl 7,65 g/l, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,724 g/l, NaPO<sub>4</sub> 0,210 g/l, pH=7.2) ont été ajoutés et une centrifugation à 1000 rpm pendant 10 minutes a été réalisée pour éliminer les plaquettes libres. Le surnageant a été éliminé. Le culot a été resuspendu dans 300 µl de PBS. Dans le tube « isotypique », les différents anticorps (Ac) isotypiques ont été ajoutés: 5 µl d'Ac Ig1 de souris couplé au FITC (fluoresceinisothiocyanate) (Invitrogen<sup>®</sup>, ref: A07795), 5 µl d'Ac Ig1 de souris couplé à l'ECD (phycoerythrin-Texas Red conjugate) (Coulter Beckman<sup>®</sup>, ref: A07797). Dans le tube test, les différents anticorps spécifiques ont été ajoutés: 5 µl d'Ac de souris anti-CD14 couplé à l'Alexa Fluor 488 (Becton Dickinson<sup>®</sup>, ref: 557700) qui marque toute la population monocyttaire, 5 µl d'Ac de souris anti-CD66b couplé à PerCP-Cy5.5 (peridinin chlorophyll-A protein + cyanine 5,5) (Becton Dickinson<sup>®</sup>,

ref: 562254) spécifique de la population de type PNN et enfin 10 µl d'Ac de souris anti-CD61 couplé à PE (phycoerythrin) (Becton Dickinson<sup>®</sup>, ref: 555754) qui est un marqueur stable et constant de la population plaquettaire. Une incubation de 15 minutes à l'abri de la lumière a été réalisée. Ensuite, une lyse des globules rouges a été effectuée en ajoutant 3 ml d'un tampon de lyse ACK (144 mmol/l chlorure d'ammonium, 17 mmol/l Tris-HCL, pH= 7,4) pendant 20 minutes à l'abri de la lumière (113). Une centrifugation à 1000 rpm pendant 10 minutes a ensuite été réalisée et le surnageant a été éliminé. Cette étape a été réalisée 2 fois (lyse des GR et centrifugation). Le culot a été resuspendu dans 1 ml de tampon PBS. Ces tubes ont été conservés à 4°C au maximum 2 heures avant la lecture au cytomètre.

Les échantillons ont été analysés par cytométrie de flux en utilisant un cytomètre FACS Calibur (Becton Dickinson<sup>®</sup>). Les résultats sont présentés en pourcentage de monocytes ou de PNN portant des plaquettes (agrégats monocytes-plaquettes ou PNN-plaquettes) par rapport à la population totale monocyttaire ou PNN (**Figure 9**).

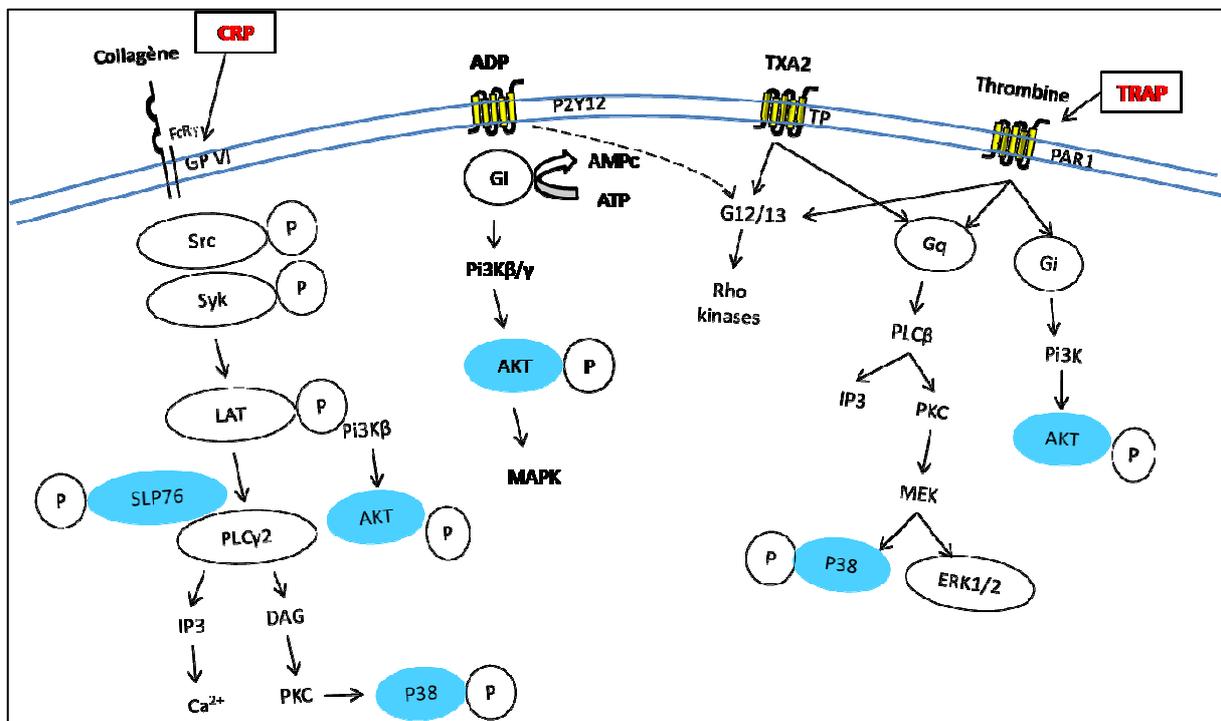


**Figure 9 : Schéma récapitulatif des principales étapes de la technique de détection et quantification des agrégats leuco-plaquettaires**

En parallèle, un échantillon de sang total a été préparé de façon similaire à la recherche d'agrégats leuco-plaquettaire mais les plaquettes ont été marquées à l'aide de 10 µl d'Ac anti-CD42 couplé à PE (Becton Dickinson®, ref: IM 1759U) qui se fixe sur la P-sélectine (marqueur membranaire d'activation plaquettaire), les PNN à l'aide de 5 µl d'Ac anti-CD66b couplé à PerCP-Cy5.5 (Becton Dickinson®, ref: 562254), les monocytes à l'aide de 5 µl d'Ac anti-CD14 couplé à l'Alexa Fluor 488 (Becton Dickinson®, ref: 557700) et les noyaux à l'aide de 1 µl de marqueur Hoechst 33342 (Invitrogen®). Les agrégats PNN-plaquettes activées et monocytes-plaquettes activées ont pu être visualisés en microscopie confocale à fluorescence (Microscope confocal Zeiss 710).

### 3. Signalisation cellulaire impliquée dans l'activation plaquettaire (Annexe n°2)

Une étude des voies de signalisation activées en aval des récepteurs couplés aux protéines G (voie de l'ADP ou de la thrombine) ou celles activées via les tyrosines kinases (voie du collagène notamment) a été réalisée chez les témoins et les patients par une technique de cytométrie de flux. Les voies de signalisation plaquettaire étudiées sont représentées schématiquement dans la **Figure 10**.



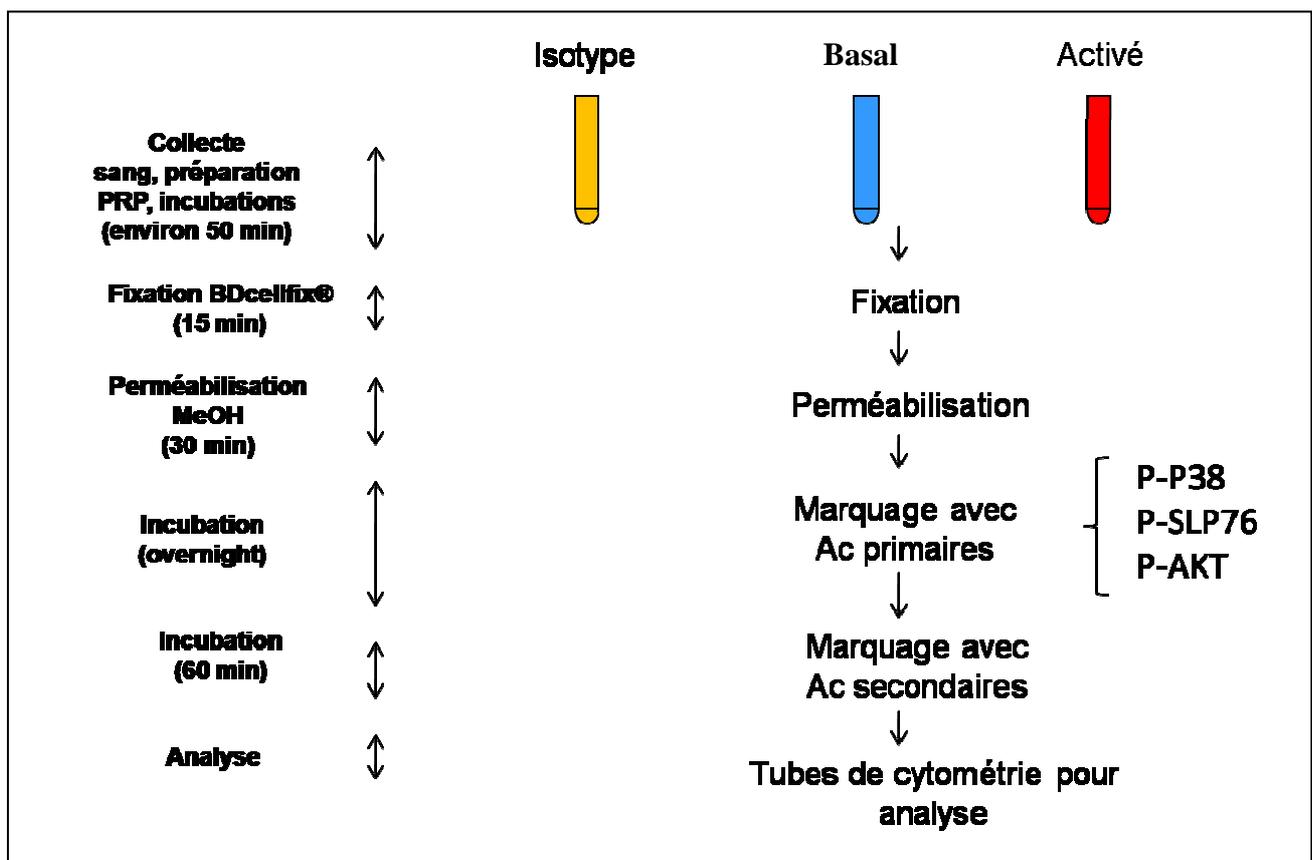
**Figure 10 : Schéma des voies de signalisation plaquettaire étudiées**

- Validation de la méthode:

Un tube de sang total anticoagulé avec du citrate de sodium a été centrifugé à 1000 rpm pendant 10 minutes pour récupérer le plasma riche en plaquettes (PRP). 300 µl de PRP ont été distribués dans 3 tubes : 1 tube « Basal » correspondant un niveau basal de phosphorylation, 1 tube « CRP\* » (contenant 1 µg/ml de Collagène Related Peptide, puissant activateur plaquettaire de la voie GPVI) correspondant au niveau de phosphorylation induit par activation du récepteur GPVI du collagène, 1 tube « TRAP » (contenant 50µmol/L de TRAP, puissant activateur plaquettaire de la voie de la thrombine) correspondant au niveau de phosphorylation induit par activation du récepteur PAR1 de la thrombine. Après 15 minutes à 37°C, les plaquettes ont été fixées en ajoutant 2 ml de fixateur commercial (Becton Dickinson® Cellfix) par tube et en incubant 15 minutes à 37°C. Chaque tube a ensuite été mis dans la glace pendant 2 minutes et les échantillons ont été dilués avec 2 ml de PBS. Une centrifugation a alors été réalisée à 2500 rpm pendant 10 minutes et le surnageant a été éliminé. Après avoir resuspendu chaque culot avec 100 µl de PBS, 900 µl de méthanol à -20°C ont été rajoutés en agitant au vortex afin de perméabiliser les membranes plaquettaires. Après 30 minutes dans la glace, 2 ml de PBS ont été rajoutés et les échantillons ont été centrifugés à 2500 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé et les culots ont été resuspendus avec 400 µl de PBS-albumine (3% albumine (w/v) PBS). Chaque échantillon a été réparti dans 4 tubes (100 µl par tube) : 1 tube « isotypique », 1 tube « p-AKT » dans lequel on ajoute 1µl d'Ac monoclonal de lapin anti-phospho AKT Ser 473 (Cell signaling®, ref : 4060L), 1 tube « p-SLP 76 » dans lequel on ajoute 1 µl d'Ac monoclonal de lapin anti-phospho SLP76 (Cell signaling®, ref : ab75829), 1 tube « p-P38 » dans lequel on ajoute 1 µl d'Ac monoclonal de lapin anti-phospho P38 MAPK (Cell signaling®, ref : 4511L). Les échantillons ont été laissés 12 heures au réfrigérateur puis 2ml de PBS-albumine (3% Albumine (w/v) PBS) ont été rajoutés et centrifugés à 2500 rpm pendant 10 minutes, le surnageant a été éliminé. Dans chaque tube, nous avons ajouté 1ml de PBS-albumine (3% Albumine (w/v) PBS) et 1 µl d'Ac secondaire anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa Fluor 488 (Invitrogen® A11070). Les échantillons ont été incubés 1 heure au réfrigérateur puis dilués dans 2 ml de PBS-albumine (3% albumine (w/v) PBS) et centrifugés à 2500 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot resuspendu dans 1ml de PBS-albumine (3% albumine (w/v) PBS).

Les échantillons ont été analysés par cytométrie de flux en utilisant un cytomètre FACS Calibur (Becton Dickinson®). Les résultats ont été présentés en moyenne géométrique d'intensité de fluorescence (MFI) de la protéine phosphorylée d'intérêt par rapport au contrôle isotypique correspondant (**Figure 11**).

La même procédure a été utilisée pour mesurer le taux basal (plaquettes au repos) de phosphorylation des protéines AKT, P38 et SLP76 chez une série de patients et de témoins.



**Figure 11 : Schéma récapitulatif des principales étapes de la technique d'analyse de la signalisation plaquettaire**

## **E. Analyse statistique**

Les logiciels SigmaStat et ExcelStat ont été utilisés pour cette étude.

Les résultats ont été exprimés en valeur moyenne  $\pm$  écarts types, ou en pourcentages.

Une comparaison des moyennes a été réalisée par un t-test de Student lorsque cela était possible. Lorsque ce test n'était pas réalisable, une comparaison des médianes a été faite par un test non paramétrique de Mann-Whitney.

Les analyses de corrélation ont été réalisées avec un test de Spearman.

La comparaison des pourcentages a été réalisée avec un test de Khi<sup>2</sup>.

Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative.

### **III. Résultats**

#### **A. Caractéristiques générales des patients**

##### **1. Caractéristiques cliniques des patients (Tableau 4)**

Quarante sept patients (36 hommes et 11 femmes) ont été inclus. La moyenne d'âge était de 69,2 ans +/- 12,9 (minimum 40, maximum 88 ans). L'IMC moyen des patients était de 25,7 +/- 4 (minimum 18,75, maximum 36,4). 30 patients (63,8%) étaient hypertendus, 13 (27,6%) étaient diabétiques, 16 (34,7%) étaient fumeurs, 25 (53,2%) avaient une dyslipidémie et 4 (8,6%) avaient des ATCD familiaux cardio-vasculaires précoces.

40 (85,1%) patients avaient un AIC, 4 (8,5%) un AIT et 3 (6,4%) une ischémie rétinienne. Le score NIHSS médian était de 1 (minimum 0, maximum 15).

Le degré de sténose moyen était de 78% +/- 16,75. 27 patients (61,3%) avaient une plaque carotidienne à prédominance hypoéchogène. 26 patients (59%) avaient une plaque irrégulière et 7 patients (15,5%) avaient un thrombus sur plaque.

Le délai médian entre l'événement neurologique et le monitoring doppler à la recherche de MES était de 2 jours (0 à 58 jours).

Tous les patients étaient traités par aspirine, 15 (31,9%) recevaient également une anticoagulation curative soit par héparine de bas poids moléculaire soit par héparine non fractionnée, 20 (42,5%) étaient traités par statines avant l'événement neurologique.

##### **2. MES, échographie et biologie chez les patients (Tableaux 4 et 5)**

Nous avons détecté des MES chez 13 patients (27,6%). Le nombre médian de MES était de 2 (minimum 0, maximum 38).

Le délai entre l'événement neurologique n'était pas statistiquement significativement différent entre les patients MES- et MES+.

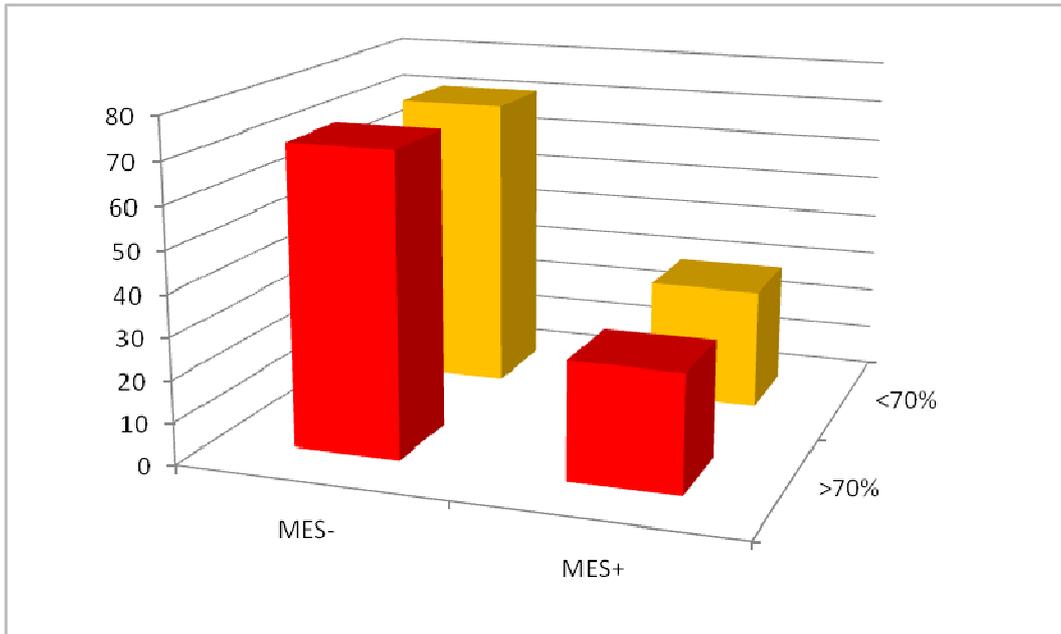
Il n'y avait pas de différence statistiquement significative pour le degré de sténose entre les patients MES- et MES+ ( $p= 0,482$ ). Le pourcentage de patients ayant des MES n'était pas différent entre les patients ayant une sténose supérieure à 70% par rapport à ceux ayant une sténose inférieure à 70% (**Figure 12**) ( $p= 0,127$ ).

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative pour l'aspect hypoéchogène de la plaque à l'échographie, l'irrégularité de la plaque et la présence d'un thrombus sur plaque entre les patients MES- et MES+.

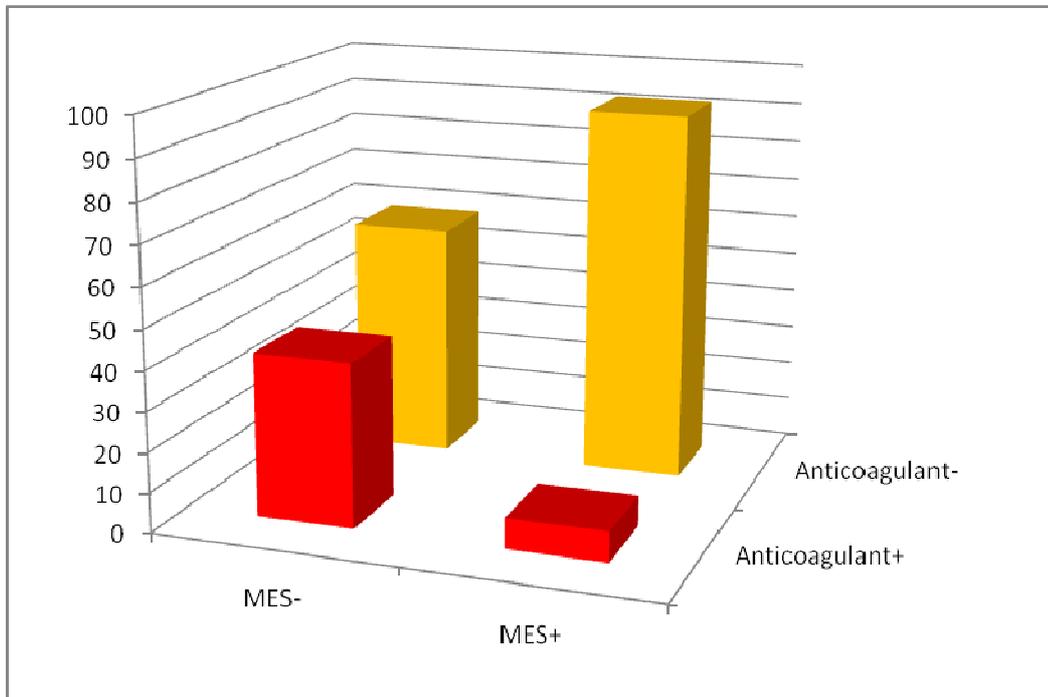
Il n'y avait pas de différence statistiquement significative pour les variables biologiques (HbA1C, du LDL cholestérol et de la Lp(a)) entre les patients MES- et MES+, ni pour les variables biologiques inflammatoires (GB, PNN, monocytes, CRP) ou pour les plaquettes.

Il est intéressant de noter qu'il y a significativement moins de patients MES+ parmi les patients traités par anticoagulants que de patients MES- ( $p= 0,035$ ) (**Figure 13, Tableau 5**).

Le pourcentage de patients traités par statines est plus faible dans le groupe MES+, mais la différence n'est pas statistiquement significative ( $p= 0,095$ ).



**Figure 12: Répartition des patients MES- et MES+ en fonction du degré de sténose carotidienne supérieur ou inférieur à 70% (exprimé en pourcentage de patients)**



**Figure 13 : Répartition des patients MES- et MES+ en fonction du traitement anticoagulant (exprimé en pourcentage de patients)**

**Tableau 4 : Caractéristiques cliniques, échographiques et recherche de MES chez les patients (n= 47) inclus dans notre étude.**

Résultats exprimés en moyenne +/- écart type ou en pourcentages

<b>Caractéristiques de la population générale</b>	
<b>Age (moyenne en années +/- écart-type)</b>	69,2 +/- 12,9
<b>Sexe masculin (% patients)</b>	76,5
<b>IMC (moyenne en kg/m<sup>2</sup> +/- écart-type)</b>	25,7 +/- 4
<b>HTA (% de patients)</b>	63,8
<b>Diabète (% de patients)</b>	27,6
<b>Dyslipidémie (% de patients)</b>	53,2
<b>Tabac (% de patients)</b>	34,7
<b>ATCD familiaux CV précoces (% de patients)</b>	8,6
<b>Événement neurologique (% de patients)</b>	
<b>AIT</b>	8,5
<b>AIC</b>	85,1
<b>Ischémie rétinienne</b>	6,4
<b>Score NIHSS à l'admission (médiane)</b>	1
<b>Degré de sténose (% moyen de sténose +/- écart-type)</b>	78 +/- 16,75
<b>Echogénicité de la plaque (% de patients)</b>	
<b>Prédominance hypoéchogène</b>	61,4
<b>Prédominance hyperéchogène</b>	38,6
<b>Irrégularité de la plaque (% de patients)</b>	59
<b>Présence d'un thrombus sur plaque (% de patients)</b>	15,5
<b>Présence de MES (% de patients)</b>	27,6
<b>Nombre médian de MES chez les patients MES+</b>	2
<b>Délai entre symptômes et recherche de MES (médiane en jours)</b>	2
<b>Traitement (% de patients) :</b>	
<b>Aspirine</b>	100
<b>Anticoagulation par héparine</b>	31,9
<b>Statines</b>	42,5

**Tableau 5 : Différences clinico-biologiques entre patients MES- (n= 34) et MES+ (n= 13)**

Résultats exprimés en % ou en moyenne +/- écarts types,  
 p calculé par un test de Mann-Whitney (médianes) ou par Khi<sup>2</sup> (%)  
 ns : non significatif, \* p<0,05

	MES- (n= 34)	MES + (n= 13)	p
<b>Délai entre symptômes et recherche de MES (médiane en jours)</b>	2	2	1 ns
<b>Degré de sténose (% sténose)</b>	76 +/- 17	79 +/- 17	0,482 ns
<b>Irrégularité plaque (% patients)</b>	58	61,5	0,8 ns
<b>Echogénicité à prédominance hypoéchogène (% patients)</b>	54,8	77	0,83 ns
<b>Présence d'un thrombus sur plaque (% de patients)</b>	12,5	23	0,72 ns
<b>HbA1C (%)</b>	6,26 +/- 1,04	6,58 +/- 1,78	0,68 ns
<b>LDL cholestérol (g/l)</b>	1,22 +/- 0,4	1,28 +/- 0,5	0,67 ns
<b>Lp(a) (g/l)</b>	0,51 +/- 0,42	0,59 +/- 0,76	0,67 ns
<b>GB (G/l)</b>	7,82 +/- 2	8,54 +/- 4,21	0,97 ns
<b>PNN (G/l)</b>	4,9 +/- 1,7	5,27 +/- 4,2	0,4 ns
<b>Monocytes (G/l)</b>	0,63 +/- 0,24	0,52 +/- 0,24	0,19 ns
<b>CRP (mg/l)</b>	5,62 +/- 4,8	5,92 +/- 5,6	0,83 ns
<b>Plaquettes (G/l)</b>	241 +/- 68	277 +/- 99	0,39 ns
<b>Anticoagulation (% de patients)</b>	41	7,6	0,035*
<b>Statines (% de patients)</b>	50	23	0,095

## **B. Dosage de l'activité enzymatique de la Lp-PLA2**

### **1. Résultats concernant l'ensemble des patients inclus dans l'étude**

#### **a) Données générales (Tableau 6)**

Tous les patients (n= 47) ont pu bénéficier du dosage de l'activité enzymatique de la Lp-PLA2 : 34 patients MES- et 13 MES+.

La valeur moyenne de la Lp-PLA2 des patients est de 181,6 (+/- 54,6) nmol/min/ml (**Figure 14**). La comparaison des valeurs de Lp-PLA2 de nos patients avec celles de sujets témoins fournies par le laboratoire Eurobio France ne montre pas de différence statistiquement significative (médianes 175.9 vs 179.2, ns). Dans notre population, 28 (59,5%) patients ont une valeur de Lp-PLA2 inférieure à la valeur seuil définie selon le laboratoire fournisseur (195 nmol/min/mL) et 19 (40,5%) patients une valeur supérieure.

Sur 47 patients, 36 sont des hommes pour lesquels la valeur moyenne de Lp-PLA2 est de 180.9 (+/- 51.2) nmol/min/ml (**Figure 15A**) et 11 sont des femmes pour lesquelles la valeur moyenne de Lp-PLA2 est de 183.7 (+/- 67.15) nmol/min/ml (**Figure 15B**). On ne note pas de différence significative entre les moyennes de ces 2 groupes (t-test, p= 0.88).

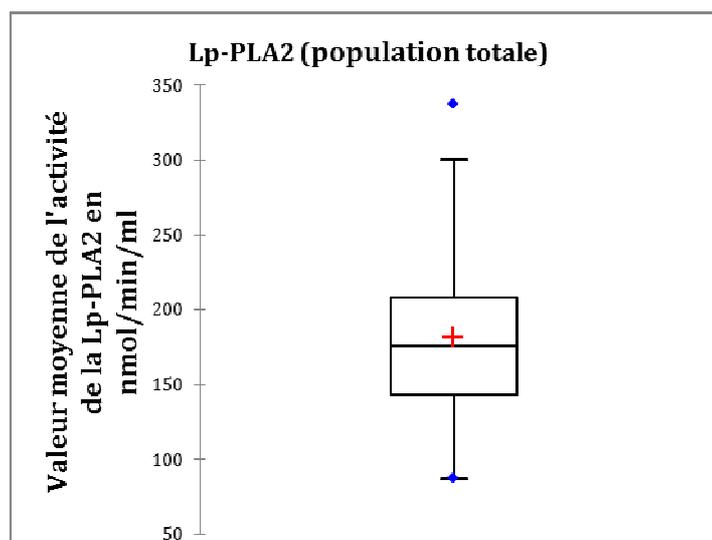
La valeur de l'activité de la Lp-PLA2 est statistiquement plus élevée chez les patients âgés de moins de 70 ans (t-test, 206 +/- 54 vs 158,1 +/- 44 ; p= 0,002) ou chez les patients fumeurs (t-test, 217,4 +/- 56 vs 165,5 +/- 43 ; p= 0,001). Elle n'est pas significativement différente en fonction du genre (hommes vs femmes, 180,9 +/- 51,2 vs 183,7 +/-67, p= 0,88), de la présence d'une HTA (170,3 +/- 54 vs 201,3 +/- 51), d'un diabète (156,8 +/- 36 vs 191 +/- 58), d'une dyslipidémie (173,2 +/- 50 vs 191 +/- 59), d'un surpoids (192,2 +/- 56 vs 181,3 +/- 54) ou d'antécédents familiaux cardiovasculaires précoces (180,3 +/- 55 vs 182,5 +/- 55).

La valeur de la Lp-PLA2 est significativement plus basse chez les patients traités préalablement par statines (t-test, 160 +/- 41 vs 197,6 +/- 56 nmol/min/ml ; p= 0,018).

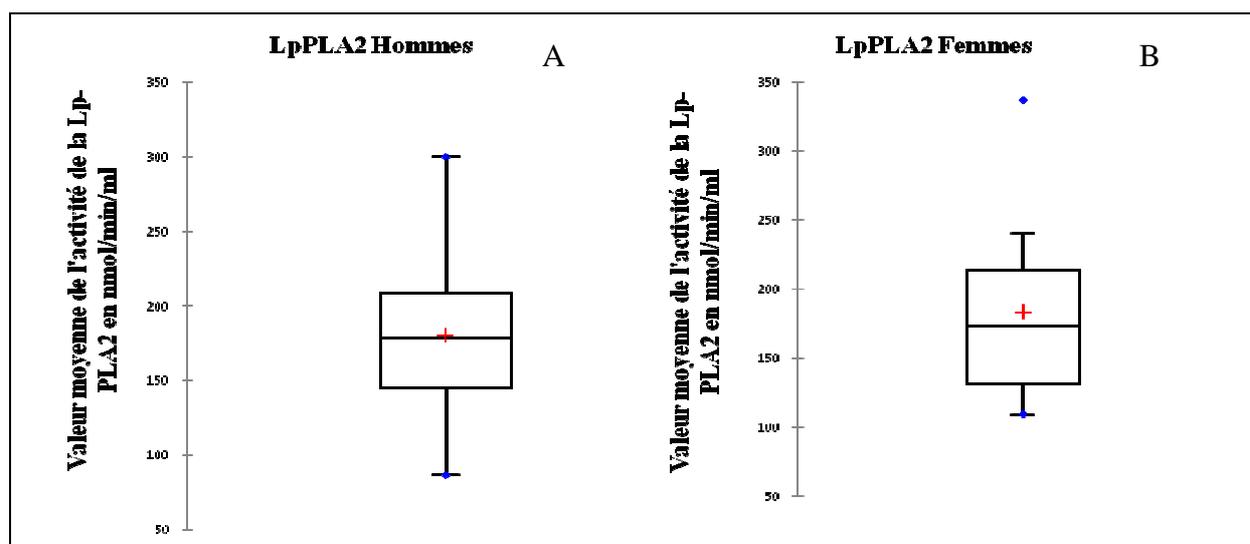
**Tableau 6 : Activité de la Lp-PLA2 en fonction de différents paramètres clinico-biologiques**

Résultats exprimés en moyenne +/- écarts types, p calculé par t-test  
(ns : non significatif, \*p<0,05, \*\*p<0,01)

	Activité de la Lp-PLA2 (nmol/min/ml)	P
<b>Population totale, n= 47</b>	181,6+/- 55	
<b>Age</b>		
< 70 ans, n= 23	158,1+/- 44	0,002**
≥ 70 ans, n= 24	206,04 +/- 54	
<b>Genre</b>		
Homme, n= 36	180.9 +/- 51.2	0,88 ns
Femme, n= 11	183.7 +/- 67.15	
<b>HTA</b>		
Oui, n= 30	170,3 +/- 54	0,061 ns
Non, n= 17	201,3 +/- 51	
<b>Diabète</b>		
Oui, n= 13	156,8 +/- 36	0,053 ns
Non, n= 34	191 +/- 59	
<b>Dyslipidémie</b>		
Oui, n= 25	173,2 +/- 50	0,27 ns
Non, n= 22	191 +/- 59	
<b>Tabac</b>		
Oui, n= 16	217,4 +/- 56	0,001**
Non, n= 30	165,5 +/- 43	
<b>ATCD fam CV précoces</b>		
Oui, n= 4	180,3 +/- 55	0,98 ns
Non, n= 42	182,5 +/- 55	
<b>Surpoids (IMC &gt; 25 m/kg<sup>2</sup>)</b>		
Oui, n= 19	192,2 +/- 56	0,55 ns
Non, n= 18	181,3 +/- 54	
<b>Statines</b>		
Oui, n= 20	160 +/- 41	0,018*
Non, n= 27	197,6 +/- 58	



**Figure 14 : Activité de la Lp-PLA2 dosée pour la totalité des patients**



**Figure 15: Activité de la Lp-PLA2 en fonction du genre des patients**

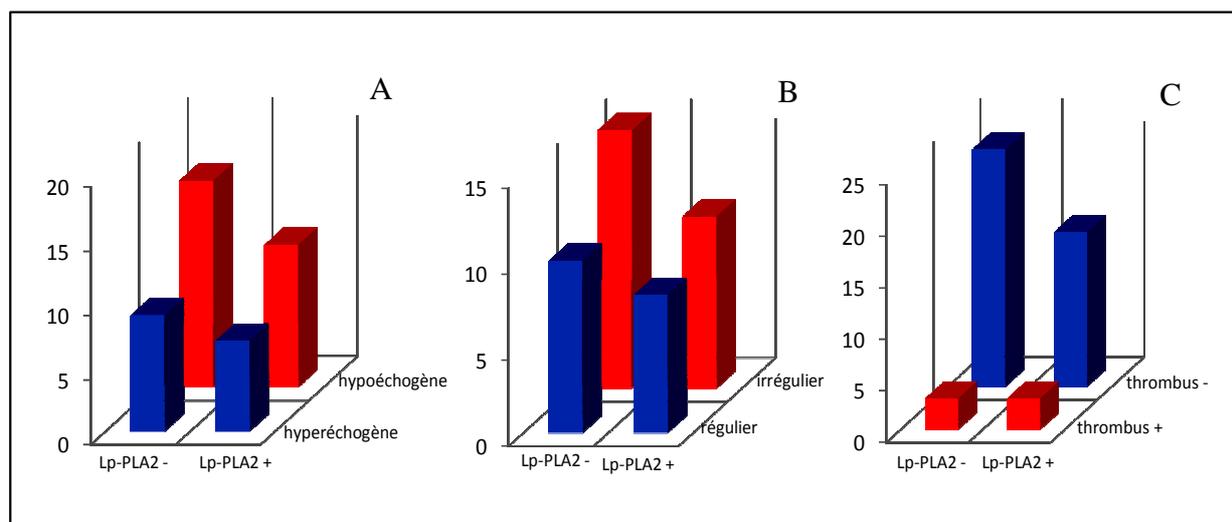
A : Hommes

B : Femmes

**Figures 14 et 15 :** Les résultats sont exprimés en moyenne (croix rouge) et écart-types. Les traits horizontaux correspondent au premier quartile (le plus bas), médiane (intermédiaire) et troisième quartile (le plus haut). Les valeurs minimum et maximum sont représentées par les points bleus.

**b) Corrélation de la valeur de Lp-PLA2 avec les données échographiques (Figure 16, Tableau 7)**

La valeur de la Lp-PLA2 ne semble pas corrélée au degré de sténose carotidienne présentée par le patient dans notre étude (Spearman,  $p=0,087$ ). De même, nous n'avons pas trouvé d'association statistiquement significative entre une valeur positive de Lp-PLA2 et l'aspect hypoéchogène de la plaque carotidienne ( $\text{Khi}^2$ ,  $p=0,83$ ), l'aspect irrégulier de la plaque ( $\text{Khi}^2$ ,  $p=0,58$ ) ou la présence d'un thrombus sur plaque ( $\text{Khi}^2$ ,  $p=0,77$ ).



**Figure 16: Population totale des patients. Etude de la Lp-PLA2 en fonction des caractéristiques échographiques de la sténose carotidiennes.**

A : Echogénicité, B : Plaque irrégulière, C : Existence d'un thrombus.

**Tableau 7 : Comparaison des données échographiques des patients ayant une valeur d'activité de Lp-PLA2 inférieure ou supérieure à la valeur seuil**

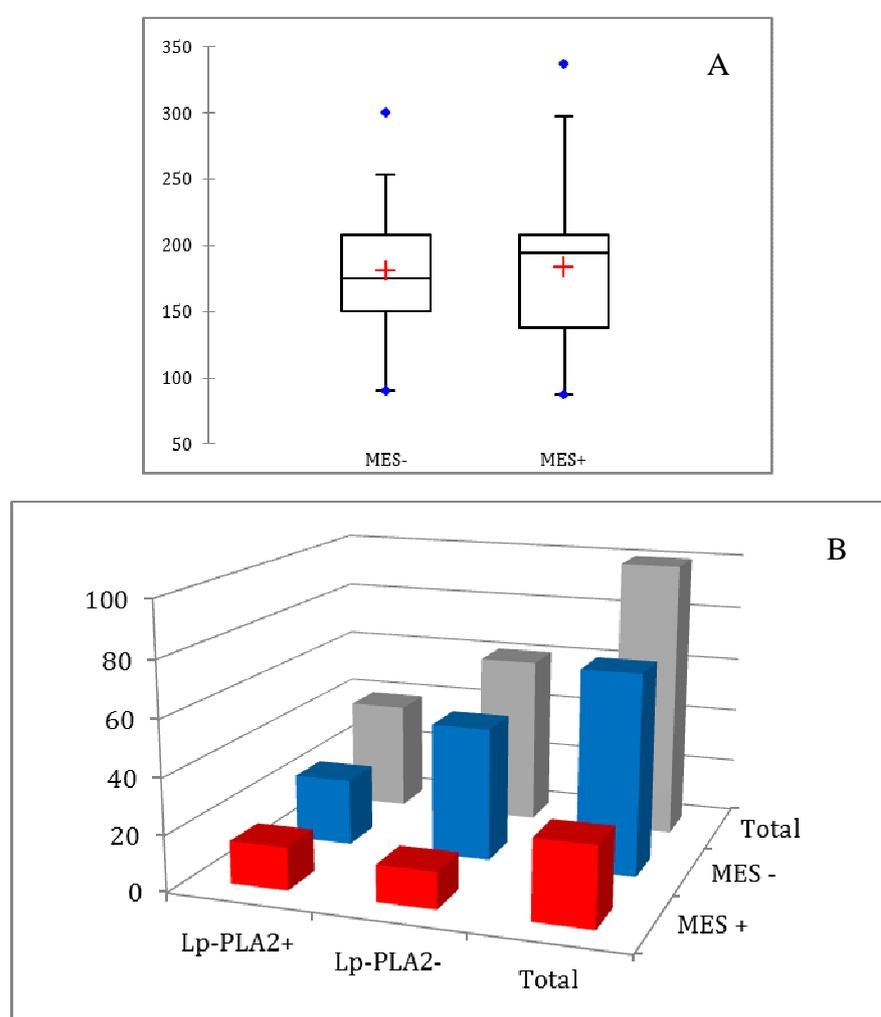
Résultats exprimés en % ou en moyenne +/- écarts types, p calculé par t-test ou par  $\text{Khi}^2$  (%)  
ns : non significatif

	Patients ayant une valeur de Lp-PLA2 < valeur seuil (n= 28)	Patients ayant une valeur de Lp-PLA2 > valeur seuil (n= 19)	p
<b>Degré de sténose (% sténose)</b>	75 +/- 16,6	82,8 +/- 16,3	0,13 ns
<b>Irrégularité plaque (% patients)</b>	61,5	52,6	0,58 ns
<b>Echogénicité à prédominance hypoéchogène (% patients)</b>	61,5	61	0,83 ns
<b>Présence d'un thrombus sur plaque (% de patients)</b>	14,8	16,7	0,77 ns

**c) Comparaison des valeurs de Lp-PLA2 chez les patients MES+ et MES-**

La valeur moyenne de Lp-PLA2 obtenues pour les patients MES+ est de 183,16 nmol/min/ml (+/- 73) et n'est pas significativement plus élevée que la valeur obtenue pour les patients MES- qui est de 180,9 nmol/min/ml (+/- 46,97) (Mann-Whitney, médianes 175, 5 vs 195,1, p= 0,75) (**Figure 17A**).

12 sur 34 patients MES- (35,3%) et 7 sur 13 patients MES+ (53,8%) ont une valeur de Lp-PLA2 supérieure à la valeur seuil (**Figure 17B**) mais cette différence n'est pas statistiquement significative (Khi<sup>2</sup>; p= 0,278).



**Figure 17 : Activité de la Lp-PLA2 en fonction de la présence (MES+) ou absence de MES (MES-)**

A : Les résultats sont exprimés en moyenne (croix rouge) et écart-types. Les traits horizontaux correspondent au premier quartile (le plus bas), médiane (intermédiaire) et troisième quartile (le plus haut). Les valeurs minimum et maximum sont représentées par les points bleus.

B : Pourcentage de patients.

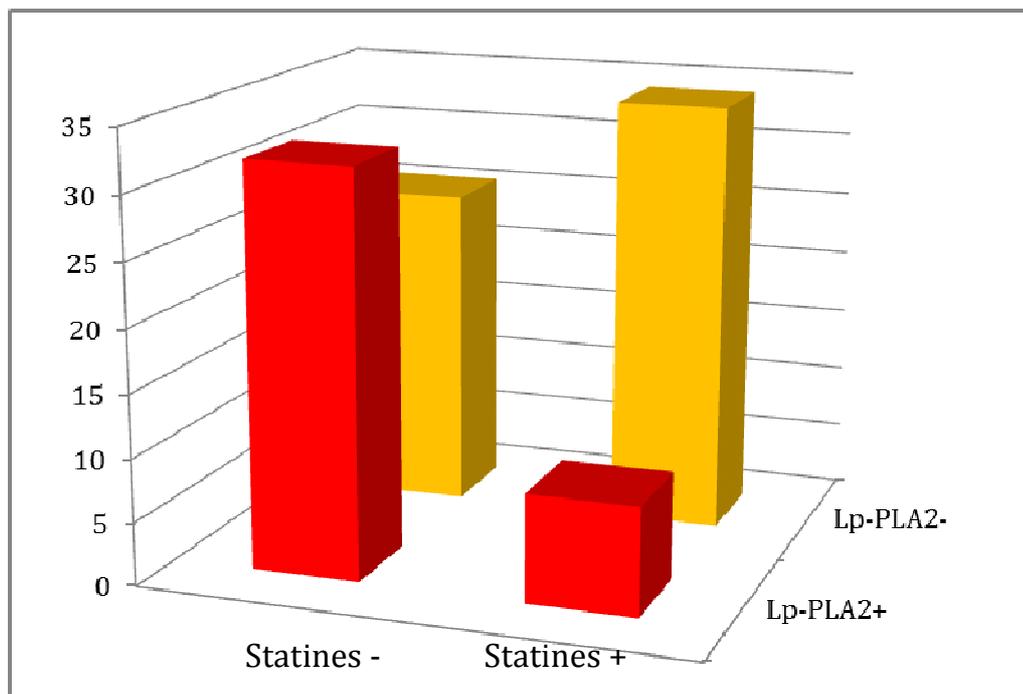
#### **d) Comparaison des données biologiques des patients en fonction de la valeur de Lp-PLA2 (Tableau 8)**

La valeur de la LP-PLA2 n'est pas corrélée aux taux d'HbA1C (Spearman,  $p= 0,235$ ). De même, il n'y a pas de différence significative des médianes d'HbA1C entre le groupe des patients qui ont une Lp-PLA2 supérieure à la valeur seuil et les autres ( $p= 0,17$ ).

Logiquement, les valeurs de la Lp-PLA2 sont corrélées aux taux de LDL cholestérol (Spearman,  $p< 0,001$ ) et il existe une différence statistiquement significative entre le taux de LDL chez les patients qui présentent une valeur de Lp-PLA2 au-dessus du seuil, comparativement aux patients ayant une valeur de Lp-PLA2 en-dessous du seuil (t-test,  $1,52 \pm 0,44$  vs  $1,09 \pm 0,38$ ,  $p< 0,001$ ). Les valeurs de Lp-PLA2 ne sont pas corrélées aux taux de la Lp(a) (Spearman,  $p= 0,39$ ), de même, il n'y a pas de différence significative de Lp(a) dans nos 2 groupes de patients.

La valeur de la Lp-PLA2 est significativement plus basse chez les patients traités préalablement par statines (160 vs 196,2 nmol/min/ml,  $p= 0,018$ ), et le pourcentage de patients traités par statines avec une valeur de Lp-PLA2 inférieure au seuil est plus élevé que le pourcentage de patients non traités par statines mais de façon significative (Khi<sup>2</sup>,  $p= 0,014$ ) (**Figure 18** et **Tableau 8**)

Concernant les variables de l'inflammation, les valeurs de la Lp-PLA2 ne sont pas corrélées aux taux de globules blancs ( $p= 0,572$ ), aux taux de PNN circulants ( $p= 0,12$ ), aux taux de monocytes ( $p= 0,588$ ) ou à la valeur de la CRP ( $p= 0,397$ ) dans notre étude. De même, la comparaison des valeurs (médianes, test de Mann-Whitney) de globules blancs, de PNN circulants et de CRP ne montre pas de différence statistiquement significative entre le groupe des patients qui ont une Lp-PLA2 supérieure à la valeur seuil et les patients qui n'ont pas d'élévation de la Lp-PLA2 au-dessus du seuil.



**Figure 18 : Répartition des patients présentant une Lp-PLA2 supérieure au seuil (Lp-PLA2+) ou inférieure au seuil (Lp-PLA2-) en fonction du traitement par Statines (exprimée en pourcentage de patients)**

**Tableau 8 : Comparaison des variables biologiques des patients ayant une valeur d'activité de Lp-PLA2 inférieure ou supérieure à la valeur seuil**

Résultats exprimés en % ou en moyenne +/- écarts types, p calculé par un test de Mann-Whitney (médianes) ou par Khi<sup>2</sup> (%)  
ns : non significatif, \* p < 0,05

	Patients ayant une valeur de Lp-PLA2 < valeur seuil (n= 28)	Patients ayant une valeur de Lp-PLA2 > valeur seuil (n=19)	p
<b>HbA1C (%)</b>	6,46 +/- 2	6,52 +/- 1,3	0,17 ns
<b>LDL cholestérol (g/l)</b>	1,09 +/- 0,4	1,52 +/- 0,4	<0.001***
<b>Lp(a) (g/l)</b>	0,66 +/- 0,7	0,43 +/- 0,3	0,18 ns
<b>GB (G/l)</b>	8,2 +/- 3,5	7,9 +/- 2,1	0,85 ns
<b>PNN (G/l)</b>	5,5 +/- 3,4	4,6 +/- 1,7	0,42 ns
<b>Monocytes (G/l)</b>	0,53 +/- 0,2	0,65 +/- 0,3	0,24 ns
<b>CRP (mg/l)</b>	5,3 +/- 5	6 +/- 4,8	0,55 ns
<b>Statines (% de patients)</b>	57,1	18,2	0,014*

## 2. Résultats concernant les patients non traités par statines

Puisque le traitement par statines peut diminuer l'activité de la Lp-PLA2 (**Figure 19**), (114). Il existe donc un facteur confondant si nous analysons ensemble les patients traités et non traités par statines. Aussi, nous avons évalué les caractéristiques clinico-biologiques des patients non traités par statines : 27 patients n'avaient pas de traitement par statines avant l'inclusion dans cette étude.

### a) **Données générales**

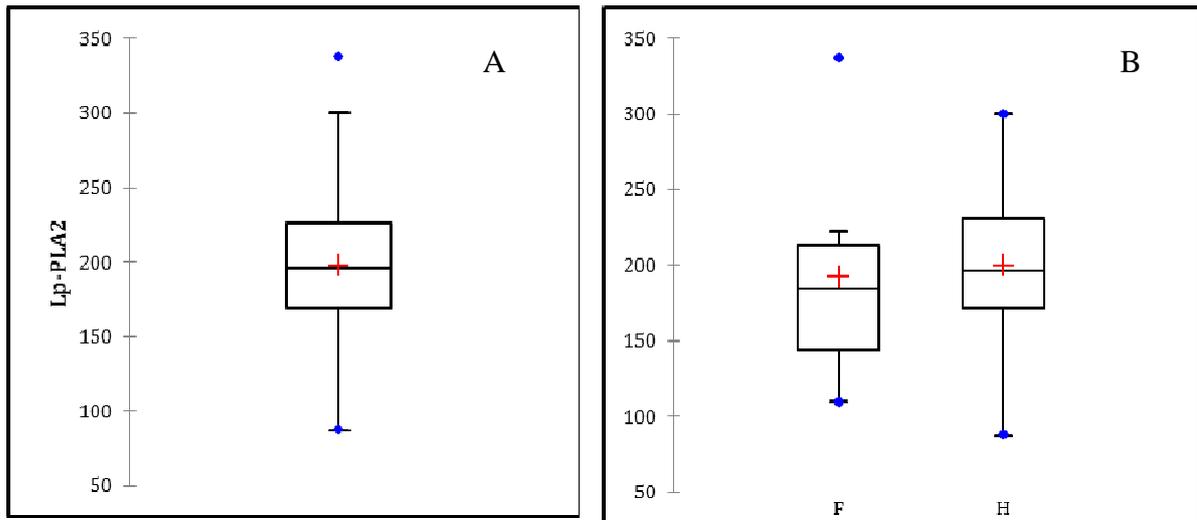
La valeur moyenne de Lp-PLA2 chez ces patients est de 197,6 nmol/min/ml (+/- 58,5). La Lp-PLA2 est plus élevée dans ce groupe que dans le groupe de sujets contrôle dont les valeurs nous ont été fournies par le laboratoire Eurobio (181,5 nmol/min/ml +/- 38,8) mais la différence est non statistiquement significative (médianes 196,2 vs 179,2,  $p= 0,17$ ) (**Figure 19A**). 12 patients (44%) ont une valeur de Lp-PLA2 inférieure à la valeur seuil et 15 patients (55,5%) une valeur supérieure à la valeur seuil de Lp-PLA2 dans ce groupe de patients non traités par statines.

Dans ce groupe, la valeur moyenne obtenue de Lp-PLA2 chez les hommes non traités par statines est de 199,3 (+/- 52,9) nmol/min/ml, elle est de 192,5 (+/- 76,8) nmol/min/ml chez les femmes. La différence n'est pas statistiquement significative (t-test,  $p= 0,79$ ) (**Figure 19B**).

### b) **Corrélation de la valeur de Lp-PLA2 avec les données échographiques**

La corrélation entre la valeur de la Lp-PLA2 et le degré de sténose carotidienne est à la limite de la significativité (Spearman,  $p= 0,058$ ) (**Figure 20**).

Il n'y a pas de corrélation entre la positivité de la Lp-PLA2 et l'aspect hypoéchogène de la plaque carotidienne (Khi<sup>2</sup>,  $p= 0,78$ ), l'aspect irrégulier de la plaque (Khi<sup>2</sup>,  $p= 0,78$ ) ou la présence d'un thrombus sur plaque (Khi<sup>2</sup>,  $p= 0,775$ ) (**Figure 21, Tableau 9**).

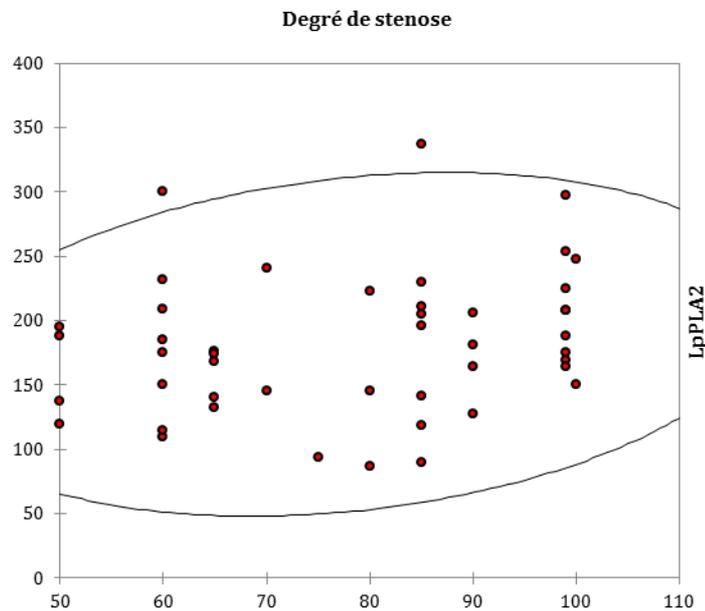


**Figure 19 : Activité de la Lp-PLA2 chez les patients non traités par statines.**

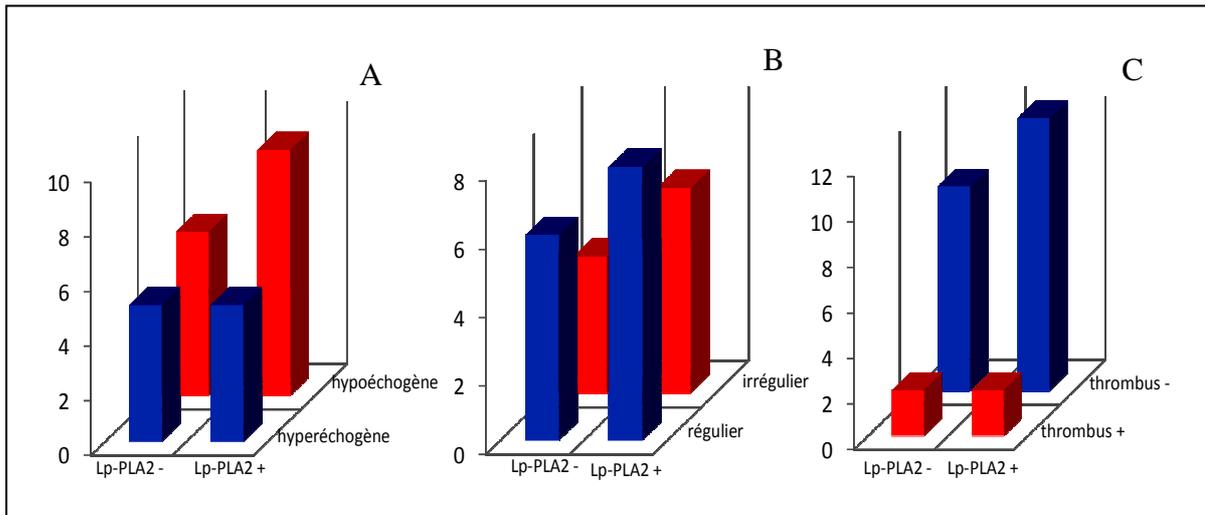
A : Tous les patients.

B : En fonction du genre.

Les résultats sont exprimés en moyenne (croix rouge) et écart-types. Les traits horizontaux correspondent au premier quartile (le plus bas), médiane (intermédiaire) et troisième quartile (le plus haut). Les valeurs minimum et maximum sont représentées par les points bleus.



**Figure 20 : Courbe de corrélation de l'activité de la Lp-PLA2 en fonction du degré de sténose carotidienne chez les patients non traités par statines**



**Figure 21 : Patients non traités par statines. Etude de la Lp-PLA2 en fonction des caractéristiques échographiques de la sténose carotidiennes.**

A : Echogénicité, B : Plaque irrégulière, C : Existence d'un thrombus

**Tableau 9: Comparaison des données échographiques des patients non traités par statines ayant une valeur de Lp-PLA2 inférieure ou supérieure à la valeur seuil**

Résultats exprimés en %, p calculé par Khi<sup>2</sup>  
ns : non significatif

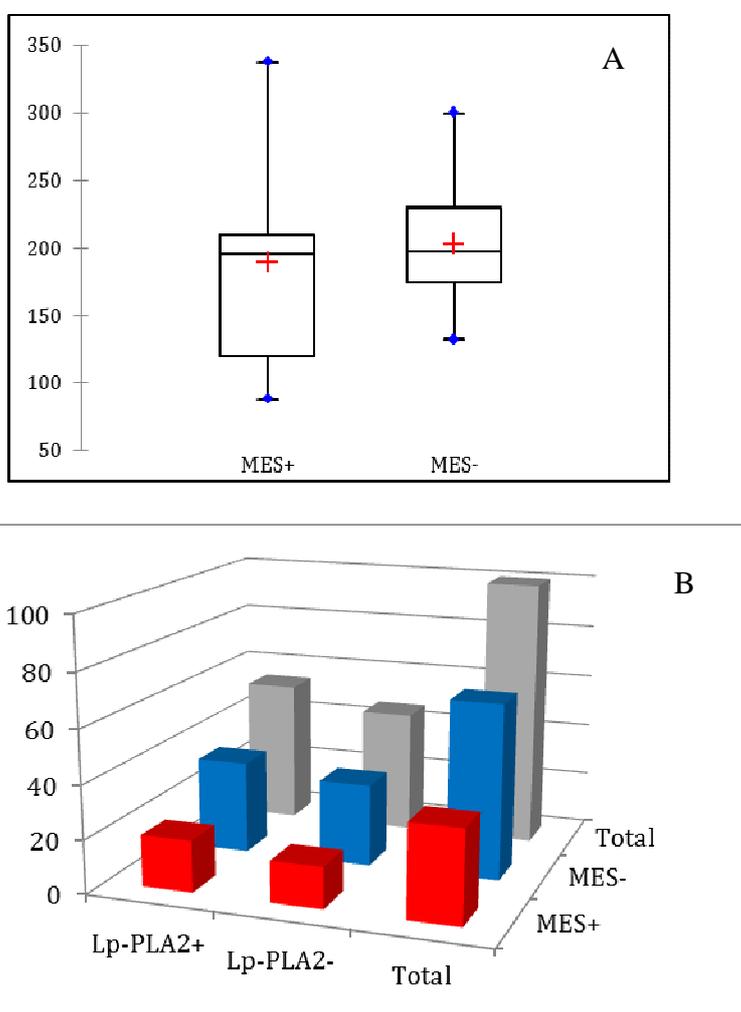
	Patients ayant une valeur de Lp-PLA2 < valeur seuil (n= 12)	Patients ayant une valeur de Lp-PLA2 > valeur seuil (n= 15)	p
Degré de sténose (% sténose)	68,6 +/-15,8	80,9 +/-16,9	0,058 ns
Irrégularité plaque (% patients)	41,6	43	0,78 ns
Echogénicité à prédominance hypoéchogène (% patients)	50	64	0,78 ns
Présence d'un thrombus sur plaque (% de patients)	25	14	0,775 ns

**c) Comparaison des valeurs de Lp-PLA2 chez les patients, non traités par statines, MES+ et MES-**

La valeur moyenne de Lp-PLA2 obtenue chez les patients MES-, 202,5 +/-42 nmol/min/ml, n'est pas statistiquement différente de la valeur 189,1 +/- 81 nmol/min/ml chez les patients MES+ (p= 0,57) (**Figure 22A**).

53% des patients MES- et 60% des patients MES+ ont une valeur de Lp-PLA2 supérieure à la valeur seuil (**Figure 22B**).

Nous ne retrouvons pas d'association statistiquement significative entre la valeur moyenne de la Lp-PLA2 (p= 0,57) ou le pourcentage de patients ayant une valeur de Lp-PLA2 supérieure à la valeur seuil (p= 0,5) et la présence de MES dans ce sous-groupe.



**Figure 22: Activité de la Lp-PLA2 en fonction de la présence (MES+) ou absence de MES (MES-) chez les patients non traités par statines.**

A : Les résultats sont exprimés en moyenne (croix rouge) et écart-types. Les traits horizontaux correspondent au premier quartile (le plus bas), médiane (intermédiaire) et troisième quartile (le plus haut). Les valeurs minimum et maximum sont représentées par les points bleus.

B : Pourcentage de patients.

**d) Comparaison des données biologiques inflammatoires des patients non traités par statines en fonction de la valeur de Lp-PLA2**

Les valeurs de Lp-PLA2 ne sont pas corrélées aux taux de globules blancs (Spearman,  $p=0,638$ ), aux taux de PNN circulants (Spearman,  $p=0,095$ ), aux taux de monocytes (Spearman,  $p=0,551$ ) ou à la valeur de la CRP (Spearman,  $p=0,529$ ).

De même, la comparaison des valeurs (médianes, test de Mann-Whitney) de globules blancs, de PNN, de monocytes circulants et de CRP ne montre pas de différence statistiquement significative entre le groupe des patients non traités par statines qui ont une Lp-PLA2 supérieure à la valeur seuil et les autres (**Tableau 10**).

**Tableau 10: Comparaison des variables biologiques inflammatoires des patients non traités par statines ayant une valeur de Lp-PLA2 inférieure ou supérieure à la valeur seuil**

Résultats exprimés en moyenne +/- écarts types,  
p calculé par un test de Mann-Whitney (médianes)  
ns : non significatif

	Patients ayant une valeur de Lp-PLA2 < valeur seuil (n= 12)	Patients ayant une valeur de Lp-PLA2 > valeur seuil (n= 15)	p
<b>GB (G/l)</b>	7,9 +/- 1,9	8,5 +/- 3,9	1 ns
<b>PNN (G/l)</b>	4,5 +/-1,3	6 +/- 3,7	0,182 ns
<b>Monocytes (G/l)</b>	0,5 +/-0,2	0,5 +/-0,2	1 ns
<b>CRP (mg/l)</b>	4,6 +/- 4,5	6,2 +/- 5,6	0,258 ns

## C. Agrégats leuco-plaquettaires

### 1. Population étudiée

Nous avons analysé les agrégats leuco-plaquettaires chez 13 témoins (6 hommes et 7 femmes) avec une moyenne d'âge de 26 ans +/- 2,5 (minimum 23, maximum 30 ans), sans facteur de risque cardio-vasculaires, sans maladie cardio-vasculaire ou inflammatoire connue, ne prenant pas de traitement pouvant interférer avec les fonctions plaquettaires (antiagrégant, anti-inflammatoire).

Nous avons pu effectuer l'analyse de ces agrégats chez 29 de nos patients dont 22 patients MES- et 7 patients MES+.

### 2. Comparaison des sous-groupes : MES+, MES- et témoins

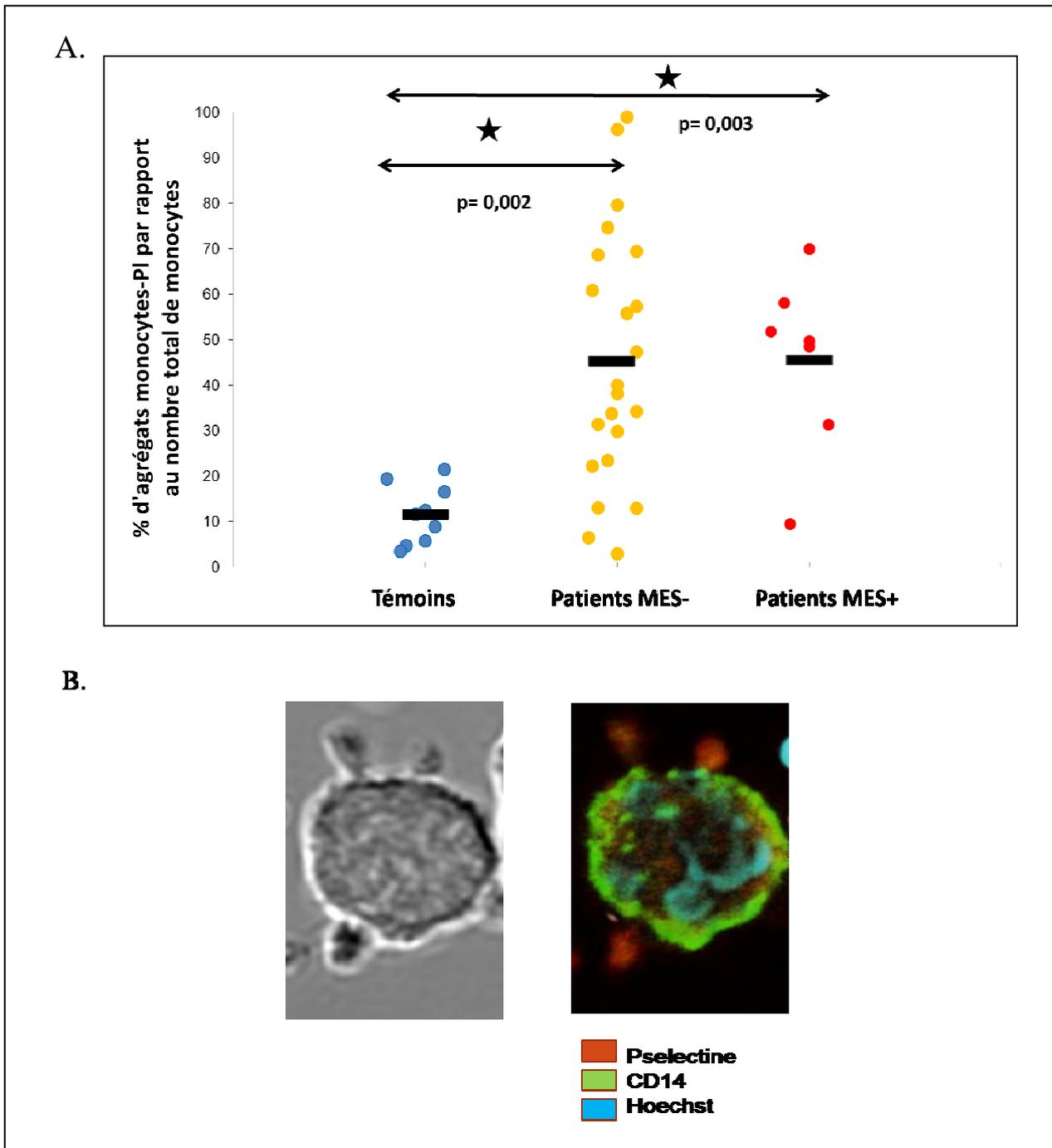
- **Agrégats monocytes-plaquettes**

Nous avons retrouvé une différence statistiquement significative en ce qui concerne le pourcentage d'agrégats monocytes-plaquettes chez les patients MES- par rapport aux témoins ( $p= 0,002$ ) et chez les patients MES+ par rapport aux témoins ( $p= 0,003$ ). Par contre, nous n'avons pas observé de différence significative entre le pourcentage d'agrégats monocytes-plaquettes des patients MES+ et MES- ( $p= 0,86$ ) (**Figure 23A**).

Grace à l'étude en microscopie confocale à fluorescence, nous avons pu observer que ce sont les plaquettes activées (exprimant la P-sélectine à leur surface) qui sont préférentiellement en interaction avec les monocytes et forment les agrégats monocytes-plaquettes (**Figure 23B**).

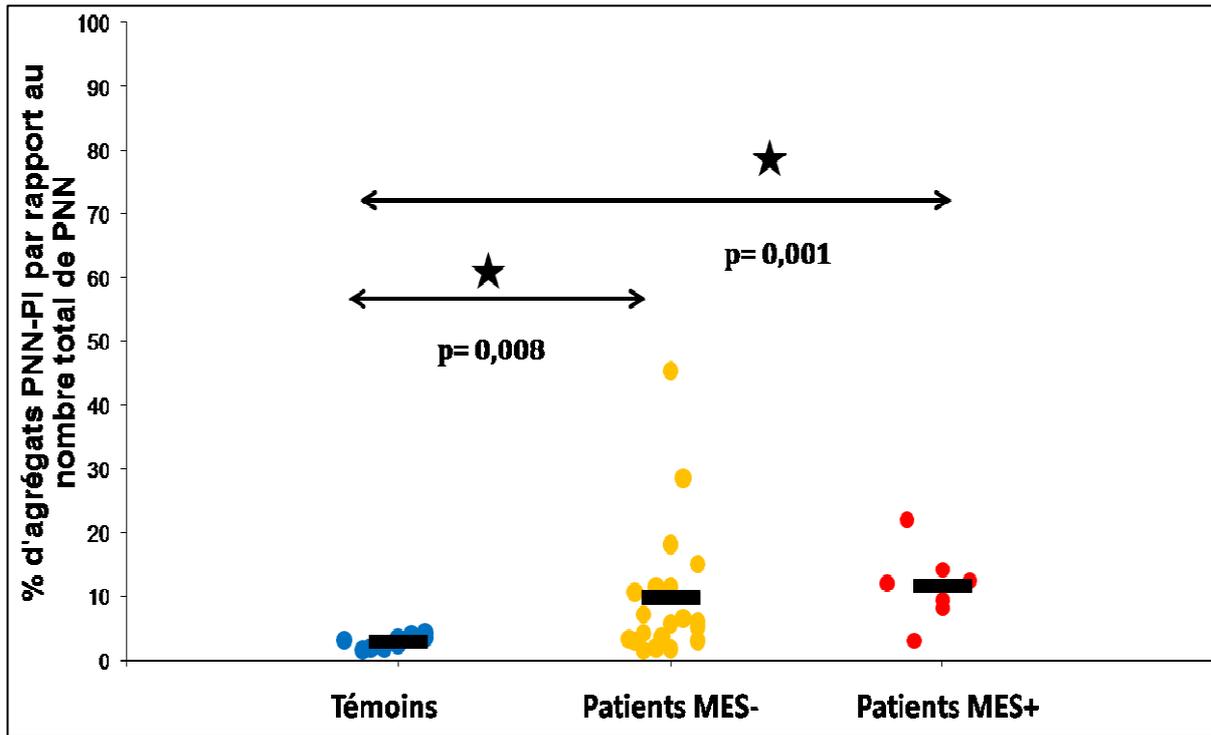
- **Agrégats PNN-plaquettes**

Nous avons retrouvé une différence statistiquement significative en ce qui concerne le pourcentage d'agrégats PNN-plaquettes entre les patients MES- et les témoins ( $p= 0,008$ ) et entre les patients MES+ et les témoins ( $p= 0,001$ ). Nous n'avons pas observé de différence significative entre le pourcentage d'agrégats PNN-plaquettes des patients MES+ et MES- ( $p= 0,24$ ) (**Figure 24**).



**Figure 23 : Agrégats monocytes-plaquettes**

- A. Pourcentage d'agrégats monocytes-plaquettes (PI) trouvé chez les témoins (n= 13), les patients MES- (n= 22) et les patients MES+ (n= 7). Les résultats sont exprimés en nuage de points du pourcentage d'agrégats monocytes-PI par rapport au nombre total de monocytes. Les moyennes sont indiquées par un trait noir. Le p est calculé par un test non paramétrique de Mann-Whitney U.
- B. Caractéristiques des agrégats monocytes-PI en microscopie confocale à fluorescence chez 1 patient MES-. Image représentative d'un agrégat monocyte-PI pris en contraste de phase (panel de gauche) et en fluorescence (panel de droite). Les plaquettes interagissant avec le monocyte sont sous forme activée (exposant la P-sélectine). Grossissement  $\times 63$ .



**Figure 24 : Agrégats PNN-plaquettes trouvés chez les témoins sains (n= 13), les patients MES- (n= 22) et les patients MES+ (n= 7).**

Les résultats sont exprimés en nuage de points. Les moyennes sont indiquées par un trait noir. Le p est calculé par un test non paramétrique de Mann-Whitney U.

### 3. Agrégats leuco-plaquettaires et données clinico-biologiques

Nous n'avons pas observé d'association statistiquement significative entre le pourcentage d'agrégats monocytes-plaquettes et le taux de monocytes circulants (Spearman,  $p= 0,536$  pour les patients,  $p= 0,228$  pour les MES-, et  $p= 0,917$  pour les MES+) ou entre le pourcentage d'agrégats PNN-plaquettes et le taux de PNN circulants (Spearman,  $p= 0,616$  pour les patients,  $p= 0,822$  pour les MES-, et  $p= 0,75$  pour les MES+). Nous n'avons pas observé d'association statistiquement significative entre le pourcentage d'agrégats monocytes-plaquettes ou d'agrégats PNN-plaquettes et le taux de CRP (Spearman, respectivement :  $p= 0,38$  et  $p= 0,132$ ).

Aucune corrélation statistiquement significative n'a été retrouvée entre le pourcentage d'agrégats monocytes-plaquettes ou d'agrégats PNN-plaquettes et le degré de sténose de la carotide (Spearman, respectivement :  $p= 0,362$  et  $p= 0,242$ ), l'irrégularité de la plaque

(respectivement t-test,  $p= 0,082$  et Mann-Whitney  $p= 0,259$ ), le caractère hypoéchogène de la plaque (Mann-Whitney respectivement  $p= 0,981$  et  $p = 0,449$ ) et la présence d'un thrombus (t-test, respectivement  $p= 0,627$  et  $p= 0,097$ ).

Le traitement par anticoagulant ne semble pas interagir avec le pourcentage d'agrégats monocytes-plaquettes (t-test,  $p= 0,832$ ) ou d'agrégats PNN-plaquettes (t-test,  $p= 0,725$ ).

## **D. Signalisation plaquettaire**

Nous avons souhaité évaluer le niveau d'activation de certaines voies de signalisation intra-plaquettaire par cytométrie de flux, chez des sujets contrôles (13 témoins) et des patients inclus dans notre étude (20 patients dont 17 MES- et 3 MES+).

### 1. Validation de la méthode au plan expérimental

Dans un premier temps, afin de valider notre méthode qui est actuellement au stade expérimental, nous avons comparé chez 4 sujets témoins, les moyennes de fluorescence (MFI) obtenues par cytométrie de flux révélant la phosphorylation de différentes protéines (p-AKT, p-P38, p-SLP76) à l'état basal, après activation par le Collagène Related Peptide (CRP\*) (agoniste du récepteur GPVI du collagène) ou par le Thrombin Receptor Activating Peptide (TRAP) (agoniste du récepteur PAR1 de la thrombine).

Concernant la phosphorylation des trois protéines étudiées, nous observons des différences statistiquement significatives entre la valeur de fluorescence obtenue à l'état basal et la valeur obtenue après activation par le CRP\* (p-AKT :  $p= 0,001$ , p-P38,  $p= 0,001$ , p-SLP76,  $p= 0,006$ ).

Par contre, il existe une différence statistiquement significatives entre la valeur obtenue à l'état basal et la valeur obtenue après activation par le TRAP seulement pour la phosphorylation de AKT et P38 (respectivement  $p= 0,003$  et  $p= 0,001$ ). Pour SLP76, la différence de fluorescence, donc de phosphorylation induite par le TRAP est non significative ( $p= 0,5$ ) (**Figure 25**).

Ces résultats reproduisent fidèlement ceux obtenus classiquement dans l'équipe en western blotting. En outre, ils indiquent que la phosphorylation de SLP76 est un marqueur relativement sélectif des voies mettant en jeu des tyrosines kinases et en particulier la voie du

récepteur GPVI du collagène. A l'inverse, AKT et P38 sont phosphorylées en aval de la majorité des récepteurs plaquettaires (ici GPVI et PAR1).

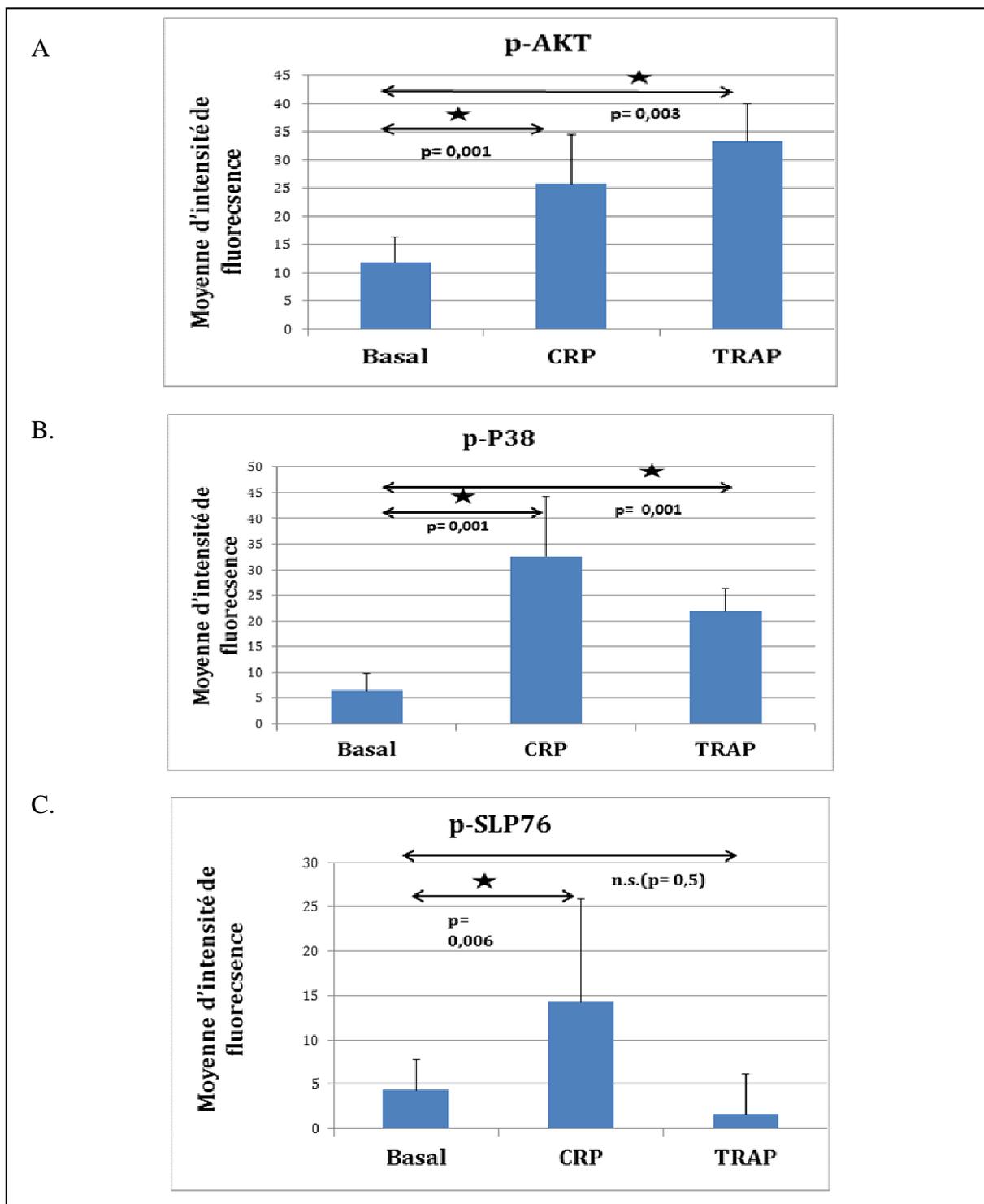
L'approche en cytométrie de flux, bien adaptée à l'étude des voies de signalisation chez les patients, apparaît donc intéressante à utiliser dans notre étude.

## 2. Résultats de l'analyse de la signalisation cellulaire par la cytométrie de flux dans notre étude

Nous avons effectué l'analyse de la signalisation plaquettaire chez 13 témoins, 17 patients MES- et 3 patients MES+.

Malheureusement, nous n'avons pas eu l'opportunité de pouvoir comparer les patients MES- et MES+ en raison du petit nombre de patients MES+ inclus dans cette étude.

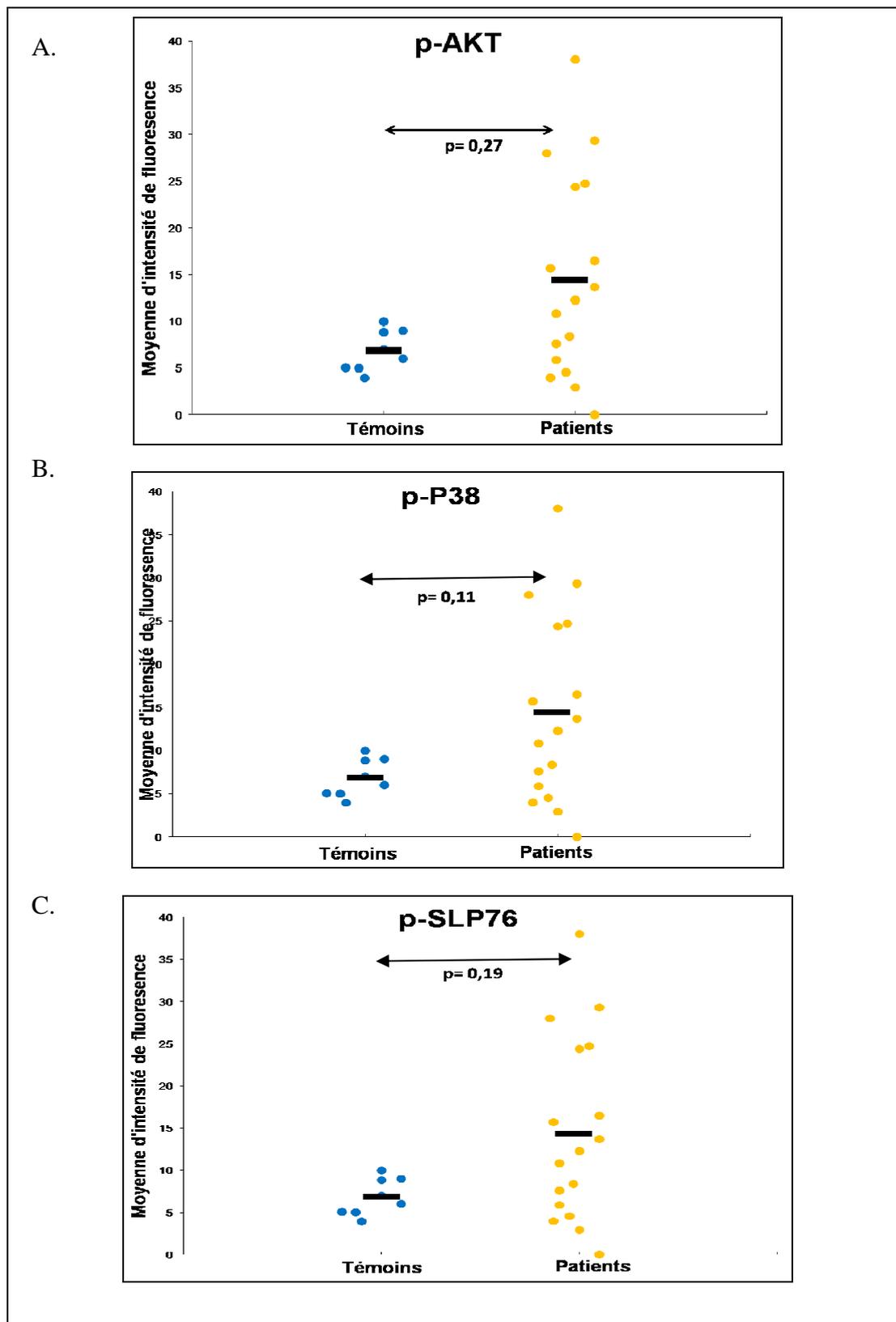
Nous avons donc analysé les niveaux de phosphorylation des protéines AKT, P38 et SLP76 à l'état basal chez les patients venant de faire un AIT ou un AIC en rapport avec une sténose carotidienne (MES- et MES+) par rapport aux témoins. Nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative entre les niveaux de phosphorylation de ces protéines à l'état basal chez les patients (MES- et MES+) par rapport aux témoins (pour p-AKT :  $p= 0,27$ , pour p-P38,  $p= 0,11$ , pour p-SLP76,  $p= 0,19$ ) (**Figure 26**).



**Figure 25 : Validation de la méthode d'analyse des voies de signalisation plaquettaire en cytométrie de flux : intensité de fluorescence de différentes protéines phosphorylées intervenant dans la signalisation plaquettaire (p-AKT, p-P38, p-SLP76) à l'état basal, activé par le CRP (1 µg/ml pendant 15 minutes à 37°C) ou activé par le TRAP (50 µmol/L pendant 15 minutes à 37°C) chez 4 témoins.**

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- écarts types. Le p est calculé par un test non paramétrique de Mann-Whitney U.

A. p-AKT, B. p-P38, C. p-SLP76



**Figure 26: Intensité de fluorescence de différentes protéines phosphorylées intervenant dans la signalisation plaquettaire (p-AKT, p-P38, p-SLP76) mesurée chez les témoins (n=13), les patients MES- (n=17) et les patients MES+ (n= 3) à l'état basal.**

Les résultats sont exprimés en nuage de points. Les moyennes sont indiquées par un trait noir. Le p est calculé par un test non paramétrique de Mann-Whitney U.

A. p-AKT, B. p-P38, C. p-SLP76

## **E. Evolution à un mois des patients inclus dans l'étude**

5 patients ont présenté des complications dans le premier mois après l'événement neurologique.

- 2 patients ont présentés 1 ou 2 récurrences d'AIT ou d'AIC dans le territoire en aval de la sténose carotidienne (avant le traitement radical de la sténose carotidienne).

Ces 2 patients avaient été inclus dans l'étude précocement après leur premier événement cérébrovasculaire : à J0 et J1. Tous les deux avaient une sténose pré-occlusive de la carotide avec une plaque à prédominance anaéchogène, irrégulière et la présence d'un thrombus flottant. 1 seul des 2 patients avait des MES. Le patient qui n'avait pas de MES avait été traité par anticoagulant à dose curative avant la recherche de MES (alors que celui qui avait des MES n'avait pas été traité par anticoagulant) (**Tableau 11**).

Chez ces 2 patients, les valeurs de la Lp-PLA2 étaient de 169,7 et de 208,3 nmol/min/ml. Seul un des 2 patients avait donc une valeur de Lp-PLA2 supérieure à la valeur seuil (**Tableau 11**).

Ces deux patients n'avaient pas été analysés en terme d'activation de la signalisation plaquettaire et d'agrégats leuco-plaquettaires.

- 3 patients ont présenté par ailleurs des complications per ou post-opératoire de l'endartériectomie de la carotide (2 sont décédés) : AIC dans le territoire d'aval de la sténose carotidienne, hématome intracérébral, arrêt cardio-respiratoire.

**Tableau 11 : Caractéristiques clinico-biologiques des 2 patients ayant présenté une récurrence d'AIT ou d'AIC dans le premier mois après l'événement neurologique**

	Patient 1	Patient 2
<b>Nombre de récurrences</b>	1	2
<b>Délai entre le 1<sup>er</sup> événement et la récurrence (en jours)</b>	9	14 et 28
<b>Degré de sténose (% sténose)</b>	Pré-occlusive	Pré-occlusive
<b>Irrégularité plaque</b>	+	+
<b>Echogénicité plaque</b>	Anaéchogène	Anaéchogène
<b>Présence d'un thrombus sur plaque</b>	+	+
<b>Présence de MES</b>	-	+
<b>Nombre de MES</b>	0	1
<b>Valeur d'activité de la Lp-PLA2 en nmol/min/ml</b>	168,7	208,3
<b>Valeur de la Lp-PLA2 supérieure à la valeur seuil</b>	-	+
<b>Traitement par statines</b>	+	+
<b>Traitement par anticoagulation curative</b>	+	-

## **IV. Discussion et Perspectives**

Notre travail évalue la corrélation entre un marqueur biologique, la Lp-PLA2, dosée de manière automatisée, et l'existence de MES, mis en évidence par une technique doppler très spécialisée, chez des patients ayant présenté un accident vasculaire neurologique récent en rapport avec une sténose athéromateuse de la carotide. En effet, actuellement la recherche de MES nous permet d'adopter une stratégie thérapeutique différente selon que le patient présente des MES (bithérapie antiagrégante) ou non (monothérapie antiagrégante) dans l'attente du traitement curatif carotidien. Or cet examen complémentaire est de réalisation difficile mais actuellement irremplaçable, notamment aucune donnée de la littérature ne permet à ce jour de corréler la présence de MES à un marqueur biologique potentiel. Nous avons dans ce travail essayé d'évaluer si l'élévation de Lp-PLA2 pouvait être corrélée à la présence de MES dans l'hypothèse que ce marqueur remplace à terme la recherche de MES chez nos patients. Par ailleurs, nous avons poursuivi nos travaux en analysant les agrégats leuco-plaquettaires et certaines voies de signalisation d'activation plaquettaire de patients inclus dans notre étude afin de clarifier certains mécanismes physiopathologiques impliqués dans les accidents neurovasculaires.

### **A. La microembolisation cérébrale**

Dans notre étude, 27,6% des patients présentent des MES. Cela est en accord avec les données de la littérature concernant la proportion trouvée de patients MES+ chez des patients qui ont présenté un AIT ou un AVC en rapport avec une sténose carotidienne (115).

Contrairement aux précédentes études, nous ne retrouvons pas d'association entre la microembolisation cérébrale et l'aspect hypoéchogène de la plaque à l'échodoppler carotidien. Cet aspect est débattu dans la littérature. *Mayor et al.* (71) retrouvent une association entre les MES et l'hypoéchogénicité de la plaque alors que *Droste et al.* (63) ne la retrouvent pas. Cela peut être expliqué par la mauvaise reproductivité inter-observateur dans la mesure du degré d'échogénicité de la plaque. Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre les MES et l'ulcération de la plaque ou la présence d'un thrombus intra-luminal. Cependant, dans les études qui ont retrouvé une association entre l'aspect ulcéré de la plaque et la microembolisation cérébrale, l'ulcération de la plaque était évaluée soit à l'angiographie

(31, 73, 74), soit macroscopiquement lors de l'endartériectomie (75) soit lors de l'étude anatomopathologique (76). D'ailleurs, l'étude de *Mayor et al.* (71) ne retrouve pas d'association entre les MES et l'ulcération de plaque visible à l'échodoppler carotidien. L'association entre la présence de MES et l'existence d'un thrombus intraluminal était également évaluée soit macroscopiquement lors de l'endartériectomie (75) soit lors de l'analyse histologique (76). Nous pouvons penser que les thrombi de petite taille peuvent ne pas être visibles à l'échodoppler. De plus, dans notre étude, les patients chez qui un thrombus aurait pu être visible étaient traités par héparine avant la recherche de MES.

Contrairement aux études antérieures (66), nous retrouvons significativement moins de patients MES+ parmi les patients traités par anticoagulants que de patients MES- (**Figure 13**). La particularité de notre étude vient du fait que la recherche de MES a été réalisée très précocement après l'événement neurologique (délai médian de 2 jours) comparativement aux autres études. Dans l'étude de *Goertler et al.* (66) où le traitement anticoagulant n'avait pas d'influence sur les MES, le délai médian de recherche des MES était de 5,6 jours.

Par ailleurs, dans ce travail, nous ne retrouvons pas d'association des MES avec le taux de PNN dans le sang contrairement à une étude émanant de notre équipe clinique mais dans laquelle les MES étaient recherchés plus tardivement (médiane de 4 jours) (82).

En fonction de ces deux divergences apparentes, notre hypothèse est qu'il pourrait exister des MES de deux origines. D'une part, il pourrait exister une origine thrombotique, liée au système de coagulation, à la phase très précoce de l'accident neurologique, peu corrélée aux caractéristiques de la plaque. Ceci est conforté par le fait que nous observons une prévalence réduite de la microembolisation cérébrale chez les patients anticoagulés. Plus tardivement, leur origine pourrait être inflammatoire (peut-être liée aux agrégats leuco-plaquettaires) et corrélée aux caractéristiques morphologiques de la plaque (degré de sténose, aspect hypoéchogène et irrégularité de la plaque).

Il serait donc intéressant d'évaluer l'intérêt du traitement anticoagulant chez les patients MES+ à la phase très précoce d'un événement cérébrovasculaire afin de voir si ce traitement permet de réduire la prévalence des MES et permet surtout de diminuer le risque de récurrence précoce.

Cela pourrait expliquer le fait que nous ne retrouvons pas une prévalence plus importante des MES chez les patients ayant une sténose carotidienne supérieure à 70% (**Figure 12**) contrairement aux précédentes études (où les MES étaient plus souvent associés aux sténoses carotidiennes supérieure à 70% (31, 48, 63, 70)). En effet, notre hypothèse est que les MES recherchés précocement (comme dans notre étude) ne seraient pas liés au degré de sténose carotidienne. De plus, 31% des patients ayant une sténose supérieure à 70% étaient sous anticoagulant, traitement qui pourrait potentiellement réduire la prévalence des MES à la phase hyperaigue.

## **B. MES et Lp-PLA2**

La Lp-PLA2 a été évaluée comme facteur de risque d'événements vasculaires ou de récurrence dans de grandes études de population aux Etats Unis. Il s'agit d'un marqueur innovant qui n'est pas encore commercialisé en France et qui n'a pas été évalué dans les centres de soins français.

La valeur seuil au 3<sup>ème</sup> tertile obtenue chez 115 sujets témoins français est similaire à celle du 3<sup>ème</sup> tertile chez les sujets témoins américains (195 nmol/min/mL). Cependant, la valeur médiane n'est pas la même (179,2 nmol/min/mL chez les sujets français versus 172 nmol/min/mL chez les sujets américains) et il existe deux valeurs seuil en fonction du sexe chez les sujets américains (184 nmol/min/mL pour les hommes et 165 nmol/min/mL pour les femmes). Nous ne disposons pas de cette donnée chez les sujets témoins français, néanmoins, dans notre étude, il ne semble pas y avoir de différence de valeur de Lp-PLA2 entre les hommes et les femmes (**Figure 15**). Cela suggère qu'il n'y a peut-être pas de nécessité de donner des valeurs seuil en fonction du genre pour la population française. Néanmoins ce point devra être confirmé après analyse d'un plus grand nombre de sujets témoins.

Le choix d'utiliser le 3<sup>ème</sup> tertile comme valeur seuil peut être discuté car toutes les études publiées sur le sujet n'utilisent pas la même valeur (dernier tertile (108) ou dernier quartile (93, 111)). Là encore, une étude portant sur une plus grande population de sujets témoins et de patients ayant fait un AVC pourrait nous permettre d'affiner la valeur seuil la plus intéressante, à l'aide de courbes ROC par exemple (dans notre étude, l'établissement d'une telle courbe n'était pas contributive en raison du petit nombre relatif de patients et de sujets témoins).

Dans notre étude, nous avons retrouvé une différence de la valeur de la Lp-PLA2 en fonction de l'âge et de l'existence d'un tabagisme (la Lp-PLA2 était significativement plus élevée chez les patients de plus de 70 ans et les patients fumeurs). Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures (107, 108, 110) qui avaient montré une différence de valeur de la Lp-PLA2 en fonction de l'âge, d'un tabagisme mais aussi du sexe, de l'ethnie, de l'existence d'un diabète, d'une obésité ou d'antécédents cardiovasculaires, ce que nous n'avons pas retrouvé, mais nos analyses statistiques manquent de puissance en raison de la taille de l'effectif analysé.

Nous avons également retrouvé logiquement une forte corrélation entre la valeur de l'activité de la Lp-PLA2 et le taux de LDL cholestérol et une diminution de la valeur de la Lp-PLA2 par le traitement par statines (**Figure 18**), ceci en accord avec les données de la littérature (116).

La Lp-PLA2 est actuellement encore un marqueur biologique en innovation en France, alors que ce dosage est commercialisé aux Etats-Unis. L'établissement des valeurs de référence est actuellement probablement plus abouti et adapté à la population américaine. Il serait donc nécessaire de définir des valeurs de référence pour la population française en incluant un plus grand nombre de sujets sains et en analysant ces valeurs en fonction de différents paramètres comme le sexe, l'âge, l'appartenance ethnique ou l'existence de facteurs de risque cardiovasculaires.

L'objectif principal de notre étude était de rechercher si la Lp-PLA2 était corrélé à la présence de MES. Le dosage de l'activité de la Lp-PLA2, réalisé chez 47 patients inclus dans un délai de 0 à 58 jours après l'événement neurologique, parmi lesquels 13 présentaient des MES, n'a pas montré de différence significative entre les patients MES+ et les patients MES- (**Figure 17**). Ce résultat est à interpréter avec prudence du fait du petit nombre de patients inclus, et notamment du faible effectif du groupe MES+ (13 patients). Les études qui ont montré que la Lp-PLA2 était un facteur de risque d'AIT ou d'AIC ou de récurrence d'événement cérébrovasculaire incluaient un très grand nombre de patients (des centaines voire des milliers) (98-101, 106, 108). La Lp-PLA2 est probablement un bon marqueur de risque d'événement cardio et cérébrovasculaires et de récurrence à l'échelle d'une population. Par contre, nos résultats suggèrent qu'elle ne semble pas être un marqueur utilisable pour orienter une prise en charge thérapeutique au niveau d'un individu dans une situation aiguë, comme nous souhaitons le faire si ce marqueur avait été corrélé aux MES. Mais néanmoins,

dans le cas d'une analyse comportant un faible effectif, on peut noter un manque de puissance des tests statistiques et l'inclusion d'un plus grand nombre de patients permettrait de conforter ce résultat.

Actuellement, ce marqueur est utilisé aux Etats Unis comme test diagnostique pour identifier les patients à haut ou très haut risque cardiovasculaire afin de leur proposer une intensification de leur traitement hypolipémiant (117). L'objectif du taux de LDL cholestérol chez les patients ayant une valeur de Lp-PLA2 supérieure à la valeur seuil est diminué de 30mg/dl par rapport à la valeur seuil recommandée calculée en fonction des facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels. Par contre, pour les patients ayant une valeur de Lp-PLA2 inférieure à la valeur seuil, l'objectif du taux de LDL cholestérol n'est pas modifié, permettant de ne pas prescrire des traitements hypolipémiants par excès (important dans le cadre des économies de santé publique).

L'intérêt de ce marqueur va peut être prendre de l'ampleur ces prochaines années car un inhibiteur de l'activité enzymatique de la Lp-PLA2 (le darapladib) (118, 119) est en cours d'essai de phase III (120, 121) afin d'évaluer son impact sur la survenue d'événements vasculaires chez des patients présentant une coronaropathie stable. Ce traitement semble diminuer la progression de la plaque d'athérome, en particulier la progression du cœur nécrotique (122). Si ces études de phase III sont positives, il serait intéressant d'évaluer ce traitement dans la prévention secondaire des AVC, en particulier ceux en rapport avec une sténose athéromateuse de la carotide.

### **C. MES et agrégats leucoplaquettaires**

Nous avons analysé les agrégats leuco-plaquettaires chez 29 patients ayant eu un AVC en rapport avec une sténose athéromateuse de la carotide (22 patients MES- et 7 patients MES+) et chez 13 témoins.

Nous avons retrouvé une différence statistiquement significative en ce qui concerne le pourcentage d'agrégats monocytes-plaquettes chez les patients MES- par rapport aux témoins et chez les patients MES+ par rapport aux témoins (**Figure 23A**). Nous avons retrouvé également une différence statistiquement significative en ce qui concerne le pourcentage d'agrégats PNN-plaquettes entre les patients MES- et les témoins et entre les patients MES+ et les témoins (**Figure 24**). Il a déjà été montré qu'il existait une augmentation des agrégats

monocytes-plaquettes et PNN-plaquettes à la phase aiguë d'un AVC (114, 115). Cette augmentation des agrégats leucocytes-plaquettes est surtout rattachée aux AVC lié à une cause athéromotique (116). De plus, *Cerletti et al.* (123) n'ont pas retrouvé d'augmentation de ces agrégats à la phase aiguë des AVC d'origine cardioembolique. La signification de ces agrégats leuco-plaquettaires dans les sténoses symptomatiques de la carotide est controversée. *Mc Cabe et al.* (83) ont retrouvé une augmentation des agrégats monocytes-plaquettes et PNN-plaquettes chez les patients ayant une sténose symptomatique de la carotide (dans les 3 premières semaines) par rapport aux patients ayant une sténose asymptomatique. Par contre, *Jurk et al.* (111) n'ont pas retrouvé de différence pour les agrégats monocytes-plaquettes ou PNN-plaquettes entre les patients ayant une sténose symptomatique ou asymptomatique de la carotide. Il existait cependant une différence des agrégats monocytes-plaquettes entre les patients ayant une sténose symptomatique ou asymptomatique de la carotide et un groupe contrôle sans sténose carotidienne. Certains auteurs (123-125) pensent que l'activation des plaquettes est nécessaire à la formation d'agrégats leucocytes-plaquettes. C'est la raison pour laquelle les traitements anti-agrégant plaquettaire comme l'aspirine, le clopidogrel, le prasugrel ou l'abciximab (anti-GpIIbIIIa) diminueraient le nombre d'agrégats leuco-plaquettaires. *Jurk et al.* (113) pensent que l'activation des monocytes est nécessaire à la formation des agrégats monocytes-plaquettes. Dans leur étude (113), les agrégats monocytes-plaquettes sont corrélés aux marqueurs d'activation monocyttaire (Cd11b (sous unité alpha de l'intégrine  $\beta 2$  Mac1) et TSP-1). Ils montrent également qu'il existe des agrégats monocytes-plaquettes impliquant des plaquettes non activées. Dans cette étude, les agrégats monocytes-plaquettes sont corrélés au degré de sténose carotidienne et au caractère hypoéchogène de la plaque. On peut donc penser qu'il existe deux origines aux agrégats monocytes-plaquettes.

Dans un premier temps, à la phase aiguë d'un AVC lié à une sténose de la carotide, il existe une activation importante des plaquettes suite à la rupture de la plaque d'athérome. Certaines études montrent une augmentation des marqueurs d'activation plaquettaire à la phase aiguë d'un AVC en rapport avec une sténose de la carotide (augmentation du CD40L soluble et de la P-sélectine soluble (113), augmentation du CD40L (126) et des marqueurs d'activation plaquettaire la P-sélectine et le CD63 à la surface des plaquettes (113)). Les plaquettes activées entraîneraient la formation d'agrégats monocytes-plaquettes et PNN-plaquettes à la phase aiguë de l'AVC. Ces agrégats disparaîtraient ensuite. Dans l'étude de *Mc Cabe et al.* (83), l'élévation du nombre d'agrégats leuco-plaquettaires n'est plus retrouvée 21

jours après l'AVC. Dans notre étude, l'analyse en microscopie confocale à fluorescence nous a montré que ce sont les plaquettes activées (exprimant la P-sélectine) qui sont préférentiellement en interaction avec les monocytes et forment les agrégats monocytes-plaquettes (**Figure 23B**).

D'autre part, les agrégats monocytes-plaquettes pourraient être formés à partir de monocytes activés. Cette activation des monocytes pourrait être corrélée aux caractéristiques de la plaque d'athérome (degré de sténose, échogénicité) et peut être à l'inflammation de la plaque (113).

Nous n'avons pas observé de différence significative entre le pourcentage d'agrégats monocytes-plaquettes ou PNN-plaquettes entre les patients MES+ et MES-, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par *Ritter et al.* (127). Les MES ne seraient pas constitués d'agrégats leuco-plaquettaires à la phase très précoce d'un AVC en rapport avec une sténose de la carotide. En effet, dans notre étude et dans l'étude de *Ritter et al.* (127), les patients étaient inclus très précocement après l'événement neurologique (médiane de 2 jours dans notre étude, moins de 4 jours dans l'étude de *Ritter et al.* (127)). Ces MES détectés précocement pourraient être liés à l'activation des plaquettes et au système de coagulation. En effet, l'étude de *Ritter et al.* (127), bien que n'incluant peu de patients (7 MES+ et 9 MES-) montre une augmentation de l'activation plaquettaire (augmentation de la P-sélectine soluble) chez les patients MES+ par rapport aux patients MES-.

Il serait intéressant d'évaluer sur un plus grand nombre de patients, à la phase très précoce d'un événement cérébrovasculaire en rapport avec une sténose carotidienne, la corrélation entre la microembolisation cérébrale et la présence de marqueurs d'activation plaquettaire (P-sélectine ou CD40L) ou de la coagulation (facteur tissulaire par exemple).

#### **D. MES et voies d'activation plaquettaire**

Lors de l'étude de la signalisation intra-plaquettaire, nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative dans les niveaux de phosphorylation de base des protéines (AKT, P38 et SLP 76) entre les patients et les témoins (**Figure 26**). Nos résultats montrent une tendance à l'augmentation dans le groupe des patients mais également une hétérogénéité importante. Plusieurs études de la littérature suggèrent une augmentation des marqueurs d'activation plaquettaire chez les patients ayant une sténose carotidienne

symptomatique par rapport à un groupe contrôle (128). En effet, *Frinjs et al.* et *Hashimoto et al.* (129, 130) montrent une augmentation de la P-sélectine soluble. De même, *Bulla et al.* (131) et *Jurk et al.* (113) montrent une augmentation du CD40L soluble. D'autres ont montré une augmentation de l'expression de la P-sélectine, de CD63 et de CD40L à la surface des plaquettes (113, 126, 132, 133). Certaines études montrent même une augmentation des marqueurs d'activation plaquettaire entre les sténoses symptomatiques et asymptomatiques : augmentation de la P-sélectine soluble et de l'expression de la P-sélectine et du CD63 à la surface des plaquettes dans l'étude *Jurk et al.* (113), augmentation du CD40L à la surface des plaquettes dans l'étude de *Cha et al.* (126). Notre étude n'a pas permis de montrer une différence significative entre les niveaux de phosphorylation de ces protéines à l'état basal chez les patients MES+ par rapport aux patients MES-. Pourtant, *Ritter et al.* (127) ont montré une augmentation des marqueurs d'activation plaquettaire chez les patients MES+ par rapport aux patients MES-. Dans leur étude, il existait une augmentation de la P-sélectine soluble chez les patients MES+ par rapport aux patients MES-.

Il est possible que nos résultats soient non contributifs du fait de certains problèmes méthodologiques :

- Nous avons étudié cette signalisation à partir de plasma riche en plaquettes préparé suite à un prélèvement veineux périphérique, il est donc possible que le signal retrouvé dans la population de plaquettes potentiellement activées soit très dilué par la quantité importante de plaquettes non activées. De plus, les plaquettes activées ont pu être potentiellement éliminées entre la plaque et le point de prélèvement sanguin.
- Il est également possible qu'en travaillant sur du plasma riche en plaquettes, les plaquettes activées, piégées dans les agrégats leuco-plaquettaires et plaquettaires, aient en fait été éliminées lors de la centrifugation initiale. L'étude en microscopie confocale montre en effet que les plaquettes associées aux monocytes sont sous une forme activée (exposant la P-sélectine).
- Les marqueurs choisis sont peut-être activés seulement de manière transitoire, pendant quelques minutes après que les plaquettes aient interagi avec la plaque d'athérome.

Notre travail est à notre connaissance la première étude qui analyse le niveau d'activation de protéines de signalisation plaquettaire par cytométrie de flux chez des patients

venant de faire une complication thrombotique. Il conviendrait donc d'améliorer ultérieurement cette technique pour en augmenter sa sensibilité. Nous pourrions, par exemple, prélever le sang au plus près de la sténose carotidienne lors des procédures d'angioplastie de la carotide. Nous pourrions également sélectionner les plaquettes activées seules ou incluses dans les agrégats par des techniques de tri soit par colonnes d'affinité avec par exemple un anticorps anti-P-sélectine soit à l'aide d'un cytomètre de flux/trieur. Cette première approche nous a permis de mieux définir les conditions expérimentales à choisir lors d'une future étude de l'activation plaquettaire chez ces patients.

## **E. Risque de récurrence d'événement cérébrovasculaire**

Même si ce n'était pas l'objectif premier de notre étude, nous avons souhaité évaluer le risque de récurrence d'AIT ou d'AIC après un premier événement cérébrovasculaire chez nos patients. Malgré le petit effectif analysé, 5 patients ont présenté des complications à un mois dont deux patients une récurrence d'accident neurovasculaire avant le traitement radical de la sténose carotidienne (les 3 autres patients ont présenté des complications per ou post-opératoires). Ces deux patients avaient été inclus précocement après le premier événement (J0 et J1). Ils présentaient tous les deux un thrombus flottant. 1 seul des 2 patients avait des MES mais le patient qui n'avait pas de MES avait été traité par anticoagulant à dose curative avant la recherche de MES. Cela pourrait être en accord avec notre hypothèse que les MES pourraient être d'origine thrombotique à la phase très précoce de l'accident neurologique et sensible au traitement anticoagulant, mais le faible effectif nous empêche de conclure précisément.

## **F. Limites de l'étude**

Notre étude comporte plusieurs limites :

- Comme évoqué précédemment, la première limite vient du petit nombre de patients inclus dans notre étude, ce qui diminue la puissance des tests statistiques. D'ailleurs, pour l'étude de la signalisation, nous n'avons pas pu étudier la différence entre les patients MES+ et MES-.
- Le groupe de sujets témoins pour l'analyse des agrégats leuco-plaquettaires et de la signalisation n'était pas apparié en âge, en sexe et pour les facteurs de risques

cardio-vasculaires. Cela peut évidemment modifier les résultats obtenus pour l'analyse des agrégats leuco-plaquettaires entre patients et témoins.

- Il existait également un biais de sélection des patients car ceux traités par clopidogrel étaient exclus de l'étude. Cette population de patients (prenant un traitement par clopidogrel probablement en prévention secondaire) auraient pu avoir des caractéristiques clinico-biologiques différentes des patients inclus dans notre étude.
- Nous avons recherché les MES sur un monitoring doppler de trente minutes. Ces signaux sont transitoires et un allongement du temps de l'examen (sur 1 heure) aurait pu améliorer la sensibilité de leur détection.
- L'étude de la signalisation plaquettaire a été réalisée à partir de plasma riche en plaquettes sur un prélèvement veineux périphérique. La population de plaquettes potentiellement activées a donc pu être diluée par la quantité importante de plaquettes non activées ou avoir été éliminée lors de la centrifugation initiale.

## V. Conclusion générale

Au total, notre étude suggère que la Lp-PLA2 n'est pas un marqueur pertinent de la microembolisation cérébrale à la phase aiguë de l'AVC. La physiopathologie de la microembolisation persistante en aval d'une plaque d'athérome carotide symptomatique ne semble pas univoque et pourrait varier en fonction du temps écoulé depuis l'évènement thrombotique révélateur. La microembolisation initiale serait liée à la coagulation et à la formation d'un thrombus instable. Le traitement anticoagulant pourrait alors avoir un intérêt notable. La persistance de signaux emboliques à un stade plus tardif serait associée à l'inflammation. Il est donc important de poursuivre la caractérisation des agrégats leucoplaquettaires et des mécanismes d'activation plaquettaire en prenant en compte les différentes phases de la pathologie. Il sera également indispensable de cibler la population plaquettaire activée en sélectionnant celles qui sont impliquées dans les microembols potentiellement à l'aide d'un cytomètre de tri. Des études en microscopie sur des prélèvements sanguins au plus près de la sténose carotidienne (lors des procédures d'angioplastie de la carotide par exemple) pourraient aider à identifier les composants cellulaires de ces micro-embolies. Ainsi, une meilleure connaissance de la biologie et de la physiopathologie des MES semble nécessaire pour élaborer des nouvelles stratégies thérapeutiques susceptibles d'améliorer la prise en charge des patients qui présentent un AVC lié à une sténose athéromateuse de la carotide.

*Vu par le professeur Vincent LARRUE*

**Professeur Vincent LARRUE**  
*Professeur Université*  
Service de Neurologie Vasculaire  
CHU TOULOUSE - Hôpital RANGUEIL  
TSA 50032 - 31059 TOULOUSE Cedex 9  
Tél. 05 61 32 31 40 - Fax 05 61 32 31 41

Vu permis d'imprimer  
Le Doyen de la Faculté  
De Médecine Rangueil

*D. ROUGE*  
D. ROUGE

## Bibliographie

1. Hollander M, Bots ML, Del Sol AI, Koudstaal PJ, Witteman JC, Grobbee DE, Hofman A, & Breteler MM (2002) Carotid plaques increase the risk of stroke and subtypes of cerebral infarction in asymptomatic elderly: the Rotterdam study. *Circulation* 105(24):2872-2877.
2. Petty GW, Brown RD, Jr., Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, & Wiebers DO (1999) Ischemic stroke subtypes: a population-based study of incidence and risk factors. *Stroke* 30(12):2513-2516.
3. Rothwell PM (2010) Carotid stenting: more risky than endarterectomy and often no better than medical treatment alone. *Lancet* 375(9719):957-959.
4. Marquardt L, Geraghty OC, Mehta Z, & Rothwell PM (2010) Low risk of ipsilateral stroke in patients with asymptomatic carotid stenosis on best medical treatment: a prospective, population-based study. *Stroke* 41(1):e11-17.
5. Grant EG, Benson CB, Moneta GL, Alexandrov AV, Baker JD, Bluth EI, Carroll BA, Eliasziw M, Gocke J, Hertzberg BS, Katanick S, Needleman L, Pellerito J, Polak JF, Rholl KS, Wooster DL, & Zierler RE (2003) Carotid artery stenosis: gray-scale and Doppler US diagnosis--Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference. *Radiology* 229(2):340-346.
6. Ferguson GG, Eliasziw M, Barr HW, Clagett GP, Barnes RW, Wallace MC, Taylor DW, Haynes RB, Finan JW, Hachinski VC, & Barnett HJ (1999) The North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial : surgical results in 1415 patients. *Stroke* 30(9):1751-1758.
7. Anonymous (1991) MRC European Carotid Surgery Trial: interim results for symptomatic patients with severe (70-99%) or with mild (0-29%) carotid stenosis. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 337(8752):1235-1243.
8. Schulte-Altedorneburg G, Droste DW, Haas N, Kemeny V, Nabavi DG, Fuzesi L, & Ringelstein EB (2000) Preoperative B-mode ultrasound plaque appearance compared with carotid endarterectomy specimen histology. *Acta Neurol Scand* 101(3):188-194.
9. Anonymous (1995) Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. *JAMA* 273(18):1421-1428.
10. Halliday A, Harrison M, Hayter E, Kong X, Mansfield A, Marro J, Pan H, Peto R, Potter J, Rahimi K, Rau A, Robertson S, Streifler J, & Thomas D (2010) 10-year stroke prevention after successful carotid endarterectomy for asymptomatic stenosis (ACST-1): a multicentre randomised trial. *Lancet* 376(9746):1074-1084.
11. Brott TG, Hobson RW, 2nd, Howard G, Roubin GS, Clark WM, Brooks W, Mackey A, Hill MD, Leimgruber PP, Sheffet AJ, Howard VJ, Moore WS, Voeks JH, Hopkins LN, Cutlip DE, Cohen DJ, Popma JJ, Ferguson RD, Cohen SN, Blackshear JL, Silver FL, Mohr JP, Lal BK, & Meschia JF (2010) Stenting versus endarterectomy for treatment of carotid-artery stenosis. *N Engl J Med* 363(1):11-23.
12. Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Warlow CP, & Barnett HJ (2004) Endarterectomy for symptomatic carotid stenosis in relation to clinical subgroups and timing of surgery. *Lancet* 363(9413):915-924.
13. Bertges DJ, Muluk V, Whittle J, Kelley M, MacPherson DS, & Muluk SC (2003) Relevance of carotid stenosis progression as a predictor of ischemic neurological outcomes. *Arch Intern Med* 163(19):2285-2289.

14. Silvestrini M, Vernieri F, Pasqualetti P, Matteis M, Passarelli F, Troisi E, & Caltagirone C (2000) Impaired cerebral vasoreactivity and risk of stroke in patients with asymptomatic carotid artery stenosis. *JAMA* 283(16):2122-2127.
15. Markus HS, King A, Shipley M, Topakian R, Cullinane M, Reihill S, Bornstein NM, & Schaafsma A (2010) Asymptomatic embolisation for prediction of stroke in the Asymptomatic Carotid Emboli Study (ACES): a prospective observational study. *Lancet Neurol* 9(7):663-671.
16. Brott TG, Halperin JL, Abbara S, Bacharach JM, Barr JD, Bush RL, Cates CU, Creager MA, Fowler SB, Friday G, Hertzberg VS, McIff EB, Moore WS, Panagos PD, Riles TS, Rosenwasser RH, & Taylor AJ (2011) 2011 ASA/ACCF/AHA/AANN/AANS/ACR/ASNR/CNS/SAIP/SCAI/SIR/SNIS/SVM/SVS guideline on the management of patients with extracranial carotid and vertebral artery disease: executive summary. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and the American Stroke Association, American Association of Neuroscience Nurses, American Association of Neurological Surgeons, American College of Radiology, American Society of Neuroradiology, Congress of Neurological Surgeons, Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of NeuroInterventional Surgery, Society for Vascular Medicine, and Society for Vascular Surgery. *Circulation* 124(4):489-532.
17. Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Fox AJ, Taylor DW, Mayberg MR, Warlow CP, & Barnett HJ (2003) Analysis of pooled data from the randomised controlled trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Lancet* 361(9352):107-116.
18. Barnett HJ, Gunton RW, Eliasziw M, Fleming L, Sharpe B, Gates P, & Meldrum H (2000) Causes and severity of ischemic stroke in patients with internal carotid artery stenosis. *JAMA* 283(11):1429-1436.
19. Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, Rankin RN, Clagett GP, Hachinski VC, Sackett DL, Thorpe KE, Meldrum HE, & Spence JD (1998) Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 339(20):1415-1425.
20. Mas JL, Chatellier G, Beyssen B, Branchereau A, Moulin T, Becquemin JP, Larrue V, Lievre M, Leys D, Bonneville JF, Watelet J, Pruvo JP, Albucher JF, Viguier A, Piquet P, Garnier P, Viader F, Touze E, Giroud M, Hosseini H, Pillet JC, Favrole P, Neau JP, & Ducrocq X (2006) Endarterectomy versus stenting in patients with symptomatic severe carotid stenosis. *N Engl J Med* 355(16):1660-1671.
21. Lovett JK, Coull AJ, & Rothwell PM (2004) Early risk of recurrence by subtype of ischemic stroke in population-based incidence studies. *Neurology* 62(4):569-573.
22. Ois A, Cuadrado-Godia E, Rodriguez-Campello A, Jimenez-Conde J, & Roquer J (2009) High risk of early neurological recurrence in symptomatic carotid stenosis. *Stroke* 40(8):2727-2731.
23. Eliasziw M, Kennedy J, Hill MD, Buchan AM, & Barnett HJ (2004) Early risk of stroke after a transient ischemic attack in patients with internal carotid artery disease. *CMAJ* 170(7):1105-1109.
24. Iannuzzi A, Wilcosky T, Mercuri M, Rubba P, Bryan FA, & Bond MG (1995) Ultrasonographic correlates of carotid atherosclerosis in transient ischemic attack and stroke. *Stroke* 26(4):614-619.
25. Gronholdt ML, Nordestgaard BG, Schroeder TV, Vorstrup S, & Sillesen H (2001) Ultrasonic echolucent carotid plaques predict future strokes. *Circulation* 104(1):68-73.

26. Mathiesen EB, Bonna KH, & Joakimsen O (2001) Echolucent plaques are associated with high risk of ischemic cerebrovascular events in carotid stenosis: the tromso study. *Circulation* 103(17):2171-2175.
27. Henderson RD, Eliasziw M, Fox AJ, Rothwell PM, & Barnett HJ (2000) Angiographically defined collateral circulation and risk of stroke in patients with severe carotid artery stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) Group. *Stroke* 31(1):128-132.
28. Marnane M, Merwick A, Sheehan OC, Hannon N, Foran P, Grant T, Dolan E, Moroney J, Murphy S, O'Rourke K, O'Malley K, O'Donohoe M, McDonnell C, Noone I, Barry M, Crowe M, Kavanagh E, O'Connell M, & Kelly PJ (2012) Carotid plaque inflammation on 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts early stroke recurrence. *Ann Neurol* 71(5):709-718.
29. Markus HS & MacKinnon A (2005) Asymptomatic embolization detected by Doppler ultrasound predicts stroke risk in symptomatic carotid artery stenosis. *Stroke* 36(5):971-975.
30. Valton L, Larrue V, le Traon AP, Massabau P, & Geraud G (1998) Microembolic signals and risk of early recurrence in patients with stroke or transient ischemic attack. *Stroke* 29(10):2125-2128.
31. Molloy J & Markus HS (1999) Asymptomatic embolization predicts stroke and TIA risk in patients with carotid artery stenosis. *Stroke* 30(7):1440-1443.
32. Corsori B, Partziguian T, Casto L, Camerlingo M, & Mamoli A (2000) Doppler microembolic signals predict ischemic recurrences in symptomatic carotid stenosis. *Acta Neurol Scand* 101(5):327-331.
33. Markus HS, Droste DW, Kaps M, Larrue V, Lees KR, Siebler M, & Ringelstein EB (2005) Dual antiplatelet therapy with clopidogrel and aspirin in symptomatic carotid stenosis evaluated using doppler embolic signal detection: the Clopidogrel and Aspirin for Reduction of Emboli in Symptomatic Carotid Stenosis (CARESS) trial. *Circulation* 111(17):2233-2240.
34. Spencer MP, Thomas GI, Nicholls SC, & Sauvage LR (1990) Detection of middle cerebral artery emboli during carotid endarterectomy using transcranial Doppler ultrasonography. *Stroke* 21(3):415-423.
35. Orlandi G, Fanucchi S, Sartucci F, & Murri L (2002) Can microembolic signals identify unstable plaques affecting symptomatology in carotid stenosis? *Stroke* 33(7):1744-1746; author reply 1744-1746.
36. Ringelstein EB, Droste DW, Babikian VL, Evans DH, Grosset DG, Kaps M, Markus HS, Russell D, & Siebler M (1998) Consensus on microembolus detection by TCD. International Consensus Group on Microembolus Detection. *Stroke* 29(3):725-729.
37. Koennecke HC, Mast H, Trocio SS, Jr., Sacco RL, Thompson JL, & Mohr JP (1997) Microemboli in patients with vertebrobasilar ischemia: association with vertebrobasilar and cardiac lesions. *Stroke* 28(3):593-596.
38. Markus H (2000) Monitoring embolism in real time. *Circulation* 102(8):826-828.
39. Markus HS, Droste DW, & Brown MM (1994) Detection of asymptomatic cerebral embolic signals with Doppler ultrasound. *Lancet* 343(8904):1011-1012.
40. Anonymous (1995) Basic identification criteria of Doppler microembolic signals. Consensus Committee of the Ninth International Cerebral Hemodynamic Symposium. *Stroke* 26(6):1123.
41. Siebler M, Rose G, Sitzer M, Bender A, & Steinmetz H (1994) Real-time identification of cerebral microemboli with US feature detection by a neural network. *Radiology* 192(3):739-742.

42. Van Zuilen EV, Mess WH, Jansen C, Van der Tweel I, Van Gijn J, & Ackerstaff GA (1996) Automatic embolus detection compared with human experts. A Doppler ultrasound study. *Stroke* 27(10):1840-1843.
43. Georgiadis D, Wenzel A, Zerkowski HR, Zierz S, & Lindner A (1998) Automated intraoperative detection of Doppler microembolic signals using the bigate approach. *Stroke* 29(1):137-139.
44. King A & Markus HS (2009) Doppler embolic signals in cerebrovascular disease and prediction of stroke risk: a systematic review and meta-analysis. *Stroke* 40(12):3711-3717.
45. Georgiadis D, Grosset DG, Quin RO, Nichol JA, Bone I, & Lees KR (1994) Detection of intracranial emboli in patients with carotid disease. *Eur J Vasc Surg* 8(3):309-314.
46. Siebler M, Sitzler M, & Steinmetz H (1992) Detection of intracranial emboli in patients with symptomatic extracranial carotid artery disease. *Stroke* 23(11):1652-1654.
47. Siebler M, Sitzler M, Rose G, Bendfeldt D, & Steinmetz H (1993) Silent cerebral embolism caused by neurologically symptomatic high-grade carotid stenosis. Event rates before and after carotid endarterectomy. *Brain* 116 ( Pt 5):1005-1015.
48. Siebler M, Kleinschmidt A, Sitzler M, Steinmetz H, & Freund HJ (1994) Cerebral microembolism in symptomatic and asymptomatic high-grade internal carotid artery stenosis. *Neurology* 44(4):615-618.
49. Eicke BM, Barth V, Kukowski B, Werner G, & Paulus W (1996) Cardiac microembolism: prevalence and clinical outcome. *J Neurol Sci* 136(1-2):143-147.
50. Georgiadis D, Hill M, Zunker P, Stogbauer F, & Ringelstein EB (1994) Anticoagulation monitoring with transcranial Doppler. *Lancet* 344(8933):1373-1374.
51. Padayachee TS, Parsons S, Theobald R, Linley J, Gosling RG, & Deverall PB (1987) The detection of microemboli in the middle cerebral artery during cardiopulmonary bypass: a transcranial Doppler ultrasound investigation using membrane and bubble oxygenators. *Ann Thorac Surg* 44(3):298-302.
52. Pugsley W, Klinger L, Paschalis C, Treasure T, Harrison M, & Newman S (1994) The impact of microemboli during cardiopulmonary bypass on neuropsychological functioning. *Stroke* 25(7):1393-1399.
53. Smith JL, Evans DH, Bell PR, & Naylor AR (1998) A comparison of four methods for distinguishing Doppler signals from gaseous and particulate emboli. *Stroke* 29(6):1133-1138.
54. Smith JL, Evans DH, Fan L, Gaunt ME, London NJ, Bell PR, & Naylor AR (1995) Interpretation of embolic phenomena during carotid endarterectomy. *Stroke* 26(12):2281-2284.
55. Markus H, Loh A, & Brown MM (1994) Detection of circulating cerebral emboli using Doppler ultrasound in a sheep model. *J Neurol Sci* 122(1):117-124.
56. Russell D, Madden KP, Clark WM, Sandset PM, & Zivin JA (1991) Detection of arterial emboli using Doppler ultrasound in rabbits. *Stroke* 22(2):253-258.
57. Markus HS & Brown MM (1993) Differentiation between different pathological cerebral embolic materials using transcranial Doppler in an in vitro model. *Stroke* 24(1):1-5.
58. Dautzat M, Deklunder G, Aldis A, Rabinovitch M, Burte F, & Bret PM (1994) Gas bubble emboli detected by transcranial Doppler sonography in patients with prosthetic heart valves: a preliminary report. *J Ultrasound Med* 13(2):129-135.
59. Georgiadis D, Grosset DG, Kelman A, Faichney A, & Lees KR (1994) Prevalence and characteristics of intracranial microemboli signals in patients with different types of prosthetic cardiac valves. *Stroke* 25(3):587-592.

60. Infeld B, Davis SM, Lichtenstein M, Mitchell PJ, & Hopper JL (1995) Crossed cerebellar diaschisis and brain recovery after stroke. *Stroke* 26(1):90-95.
61. Ritter MA, Dittrich R, Thoenissen N, Ringelstein EB, & Nabavi DG (2008) Prevalence and prognostic impact of microembolic signals in arterial sources of embolism. A systematic review of the literature. *J Neurol* 255(7):953-961.
62. Markus HS, Thomson ND, & Brown MM (1995) Asymptomatic cerebral embolic signals in symptomatic and asymptomatic carotid artery disease. *Brain* 118 ( Pt 4):1005-1011.
63. Droste DW, Dittrich R, Kemeny V, Schulte-Altendorneburg G, & Ringelstein EB (1999) Prevalence and frequency of microembolic signals in 105 patients with extracranial carotid artery occlusive disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67(4):525-528.
64. Forteza AM, Babikian VL, Hyde C, Winter M, & Pochay V (1996) Effect of time and cerebrovascular symptoms of the prevalence of microembolic signals in patients with cervical carotid stenosis. *Stroke* 27(4):687-690.
65. Valton L, Larrue V, Pavy Le Traon A, & Geraud G (1997) Cerebral microembolism in patients with stroke or transient ischaemic attack as a risk factor for early recurrence. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63(6):784-787.
66. Goertler M, Blaser T, Krueger S, Hofmann K, Baeumer M, & Wallesch CW (2002) Cessation of embolic signals after antithrombotic prevention is related to reduced risk of recurrent arterioembolic transient ischaemic attack and stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72(3):338-342.
67. Goertler M, Baeumer M, Kross R, Blaser T, Lutze G, Jost S, & Wallesch CW (1999) Rapid decline of cerebral microemboli of arterial origin after intravenous acetylsalicylic acid. *Stroke* 30(1):66-69.
68. Junghans U & Siebler M (2003) Cerebral microembolism is blocked by tirofiban, a selective nonpeptide platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist. *Circulation* 107(21):2717-2721.
69. Wong KS, Chen C, Fu J, Chang HM, Suwanwela NC, Huang YN, Han Z, Tan KS, Ratanakorn D, Chollate P, Zhao Y, Koh A, Hao Q, & Markus HS (2010) Clopidogrel plus aspirin versus aspirin alone for reducing embolisation in patients with acute symptomatic cerebral or carotid artery stenosis (CLAIR study): a randomised, open-label, blinded-endpoint trial. *Lancet Neurol* 9(5):489-497.
70. Babikian VL, Hyde C, Pochay V, & Winter MR (1994) Clinical correlates of high-intensity transient signals detected on transcranial Doppler sonography in patients with cerebrovascular disease. *Stroke* 25(8):1570-1573.
71. Mayor I, Comelli M, Vassileva E, Burkhard P, & Sztajzel R (2003) Microembolic signals and carotid plaque morphology: a study of 71 patients with moderate or high grade carotid stenosis. *Acta Neurol Scand* 108(2):114-117.
72. Zhang C, Qu S, Li H, Li G, Chen G, Wang J, & Wu C (2009) Microembolic signals and carotid plaque characteristics in patients with asymptomatic carotid stenosis. *Scand Cardiovasc J* 43(5):345-351.
73. Valton L, Larrue V, Arrue P, Geraud G, & Bes A (1995) Asymptomatic cerebral embolic signals in patients with carotid stenosis. Correlation with appearance of plaque ulceration on angiography. *Stroke* 26(5):813-815.
74. Orlandi G, Parenti G, Bertolucci A, Puglioli M, Collavoli P, & Murri L (1997) Carotid plaque features on angiography and asymptomatic cerebral microembolism. *Acta Neurol Scand* 96(3):183-186.
75. Zuromskis T, Wetterholm R, Lindqvist JF, Svedlund S, Sixt C, Jatuzis D, Obelieniene D, Caidahl K, & Volkmann R (2008) Prevalence of micro-emboli in symptomatic high

- grade carotid artery disease: a transcranial Doppler study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 35(5):534-540.
76. Sitzer M, Muller W, Siebler M, Hort W, Kniemeyer HW, Jancke L, & Steinmetz H (1995) Plaque ulceration and lumen thrombus are the main sources of cerebral microemboli in high-grade internal carotid artery stenosis. *Stroke* 26(7):1231-1233.
  77. Stork JL, Kimura K, Levi CR, Chambers BR, Abbott AL, & Donnan GA (2002) Source of microembolic signals in patients with high-grade carotid stenosis. *Stroke* 33(8):2014-2018.
  78. Ritter MA, Theismann K, Schmiedel M, Ringelstein EB, & Dittrich R (2012) Vascularization of carotid plaque in recently symptomatic patients is associated with the occurrence of transcranial microembolic signals. *Eur J Neurol*.
  79. Moustafa RR, Izquierdo-Garcia D, Jones PS, Graves MJ, Fryer TD, Gillard JH, Warburton EA, & Baron JC (2010) Watershed infarcts in transient ischemic attack/minor stroke with > or = 50% carotid stenosis: hemodynamic or embolic? *Stroke* 41(7):1410-1416.
  80. Warburton L & Gillard J (2006) Functional imaging of carotid atheromatous plaques. *J Neuroimaging* 16(4):293-301.
  81. Aronow HD, Shishehbor M, Davis DA, Katzan IL, Bhatt DL, Bajzer CT, Abou-Chebl A, Derk KW, Whitlow PL, & Yadav JS (2005) Leukocyte count predicts microembolic Doppler signals during carotid stenting: a link between inflammation and embolization. *Stroke* 36(9):1910-1914.
  82. Nasr N, Ruidavets JB, Arnal JF, Sie P, & Larrue V (2009) Association of neutrophil count with microembolization in patients with symptomatic carotid artery stenosis. *Atherosclerosis* 207(2):519-523.
  83. McCabe DJ, Harrison P, Mackie IJ, Sidhu PS, Purdy G, Lawrie AS, Watt H, Machin SJ, & Brown MM (2005) Increased platelet count and leucocyte-platelet complex formation in acute symptomatic compared with asymptomatic severe carotid stenosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76(9):1249-1254.
  84. Penz S, Reininger AJ, Brandl R, Goyal P, Rabie T, Bernlochner I, Rother E, Goetz C, Engelmann B, Smethurst PA, Ouwehand WH, Farndale R, Nieswandt B, & Siess W (2005) Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J* 19(8):898-909.
  85. Tsimikas S, Willeit J, Knoflach M, Mayr M, Egger G, Notdurfter M, Witztum JL, Wiedermann CJ, Xu Q, & Kiechl S (2009) Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, ferritin levels, metabolic syndrome, and 10-year cardiovascular and non-cardiovascular mortality: results from the Bruneck study. *Eur Heart J* 30(1):107-115.
  86. Persson M, Hedblad B, Nelson JJ, & Berglund G (2007) Elevated Lp-PLA2 levels add prognostic information to the metabolic syndrome on incidence of cardiovascular events among middle-aged nondiabetic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(6):1411-1416.
  87. Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MM, & Witteman JC (2005) Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Circulation* 111(5):570-575.
  88. Kardys I, Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, Breteler MM, & Witteman JC (2006) Lipoprotein-associated phospholipase A2 and measures of extracoronary atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(3):631-636.
  89. Sabatine MS, Morrow DA, O'Donoghue M, Jablonksi KA, Rice MM, Solomon S, Rosenberg Y, Domanski MJ, & Hsia J (2007) Prognostic utility of lipoprotein-

- associated phospholipase A2 for cardiovascular outcomes in patients with stable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(11):2463-2469.
90. Robins SJ, Collins D, Nelson JJ, Bloomfield HE, & Asztalos BF (2008) Cardiovascular events with increased lipoprotein-associated phospholipase A(2) and low high-density lipoprotein-cholesterol: the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(6):1172-1178.
  91. Gerber Y, McConnell JP, Jaffe AS, Weston SA, Killian JM, & Roger VL (2006) Lipoprotein-associated phospholipase A2 and prognosis after myocardial infarction in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(11):2517-2522.
  92. Corsetti JP, Rainwater DL, Moss AJ, Zareba W, & Sparks CE (2006) High lipoprotein-associated phospholipase A2 is a risk factor for recurrent coronary events in postinfarction patients. *Clin Chem* 52(7):1331-1338.
  93. Elkind MS, Tai W, Coates K, Paik MC, & Sacco RL (2009) Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and risk of recurrent stroke. *Cerebrovasc Dis* 27(1):42-50.
  94. Herrmann J, Mannheim D, Wohlert C, Versari D, Meyer FB, McConnell JP, Gossel M, Lerman LO, & Lerman A (2009) Expression of lipoprotein-associated phospholipase A(2) in carotid artery plaques predicts long-term cardiac outcome. *Eur Heart J* 30(23):2930-2938.
  95. Thompson A, Gao P, Orfei L, Watson S, Di Angelantonio E, Kaptoge S, Ballantyne C, Cannon CP, Criqui M, Cushman M, Hofman A, Packard C, Thompson SG, Collins R, & Danesh J (2010) Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet* 375(9725):1536-1544.
  96. Schaloske RH & Dennis EA (2006) The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 1761(11):1246-1259.
  97. Hakkinen T, Luoma JS, Hiltunen MO, Macphee CH, Milliner KJ, Patel L, Rice SQ, Tew DG, Karkola K, & Yla-Herttuala S (1999) Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(12):2909-2917.
  98. Stafforini DM, Elstad MR, McIntyre TM, Zimmerman GA, & Prescott SM (1990) Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* 265(17):9682-9687.
  99. Shi Y, Zhang P, Zhang L, Osman H, Mohler ER, 3rd, Macphee C, Zalewski A, Postle A, & Wilensky RL (2007) Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in leukocyte activation and inflammatory responses. *Atherosclerosis* 191(1):54-62.
  100. Quinn MT, Parthasarathy S, & Steinberg D (1988) Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(8):2805-2809.
  101. Kolodgie FD, Burke AP, Skorija KS, Ladich E, Kutys R, Makuria AT, & Virmani R (2006) Lipoprotein-associated phospholipase A2 protein expression in the natural progression of human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(11):2523-2529.
  102. Mannheim D, Herrmann J, Versari D, Gossel M, Meyer FB, McConnell JP, Lerman LO, & Lerman A (2008) Enhanced expression of Lp-PLA2 and lysophosphatidylcholine in symptomatic carotid atherosclerotic plaques. *Stroke* 39(5):1448-1455.
  103. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cooney J, Macphee CH, Suckling KE, Krishna M, Wilkinson FE, Rumley A, & Lowe GD (2000) Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease.

- West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 343(16):1148-1155.
104. Anderson JL (2008) Lipoprotein-associated phospholipase A2: an independent predictor of coronary artery disease events in primary and secondary prevention. *Am J Cardiol* 101(12A):23F-33F.
  105. Koenig W, Khuseynova N, Lowel H, Trischler G, & Meisinger C (2004) Lipoprotein-associated phospholipase A2 adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *Circulation* 110(14):1903-1908.
  106. Daniels LB, Laughlin GA, Sarno MJ, Bettencourt R, Wolfert RL, & Barrett-Connor E (2008) Lipoprotein-associated phospholipase A2 is an independent predictor of incident coronary heart disease in an apparently healthy older population: the Rancho Bernardo Study. *J Am Coll Cardiol* 51(9):913-919.
  107. Persson M, Nilsson JA, Nelson JJ, Hedblad B, & Berglund G (2007) The epidemiology of Lp-PLA(2): distribution and correlation with cardiovascular risk factors in a population-based cohort. *Atherosclerosis* 190(2):388-396.
  108. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Heiss G, & Sharrett AR (2004) Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 109(7):837-842.
  109. Corson MA, Jones PH, & Davidson MH (2008) Review of the evidence for the clinical utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 as a cardiovascular risk marker. *Am J Cardiol* 101(12A):41F-50F.
  110. Brilakis ES, Khera A, McGuire DK, See R, Banerjee S, Murphy SA, & de Lemos JA (2008) Influence of race and sex on lipoprotein-associated phospholipase A2 levels: observations from the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis* 199(1):110-115.
  111. Delgado P, Chacon P, Penalba A, Pelegri D, Garcia-Berrocoso T, Giralt D, Santamarina E, Ribo M, Maisterra O, Alvarez-Sabin J, Rosell A, & Montaner J (2012) Lipoprotein-associated phospholipase A(2) activity is associated with large-artery atherosclerotic etiology and recurrent stroke in TIA patients. *Cerebrovasc Dis* 33(2):150-158.
  112. Brott T, Adams HP, Jr., Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, Spilker J, Holleran R, Eberle R, Hertzberg V, & et al. (1989) Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 20(7):864-870.
  113. Jurk K, Ritter MA, Schriek C, Van Aken H, Droste DW, Ringelstein EB, & Kehrel BE (2010) Activated monocytes capture platelets for heterotypic association in patients with severe carotid artery stenosis. *Thromb Haemost* 103(6):1193-1202.
  114. Lee SH, Kang SM, Park S, Jang Y, Chung N, & Choi D (2011) The effects of statin monotherapy and low-dose statin/ezetimibe on lipoprotein-associated phospholipase A(2). *Clin Cardiol* 34(2):108-112.
  115. Vukovic-Cvetkovic V (2012) Microembolus detection by transcranial Doppler sonography: review of the literature. *Stroke Res Treat* 2012:382361.
  116. Saougos VG, Tambaki AP, Kalogirou M, Kostapanos M, Gazi IF, Wolfert RL, Elisaf M, & Tselepis AD (2007) Differential effect of hypolipidemic drugs on lipoprotein-associated phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(10):2236-2243.
  117. Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ, Anderson JL, Gorelick PB, Jones PH, Lerman A, McConnell JP, & Weintraub HS (2008) Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. *Am J Cardiol* 101(12A):51F-57F.

118. Blackie JA, Bloomer JC, Brown MJ, Cheng HY, Hammond B, Hickey DM, Ife RJ, Leach CA, Lewis VA, Macphee CH, Milliner KJ, Moores KE, Pinto IL, Smith SA, Stansfield IG, Stanway SJ, Taylor MA, & Theobald CJ (2003) The identification of clinical candidate SB-480848: a potent inhibitor of lipoprotein-associated phospholipase A2. *Bioorg Med Chem Lett* 13(6):1067-1070.
119. Macphee CH (2001) Lipoprotein-associated phospholipase A2: a potential new risk factor for coronary artery disease and a therapeutic target. *Curr Opin Pharmacol* 1(2):121-125.
120. White H, Held C, Stewart R, Watson D, Harrington R, Budaj A, Steg PG, Cannon CP, Krug-Gourley S, Wittes J, Trivedi T, Tarka E, & Wallentin L (2010) Study design and rationale for the clinical outcomes of the STABILITY Trial (STabilization of Atherosclerotic plaque By Initiation of darapLadIb TherapY) comparing darapladib versus placebo in patients with coronary heart disease. *Am Heart J* 160(4):655-661.
121. O'Donoghue ML, Braunwald E, White HD, Serruys P, Steg PG, Hochman J, Maggioni AP, Bode C, Weaver D, Johnson JL, Cicconetti G, Lukas MA, Tarka E, & Cannon CP (2011) Study design and rationale for the Stabilization of pLaques usIng Darapladib-Thrombolysis in Myocardial Infarction (SOLID-TIMI 52) trial in patients after an acute coronary syndrome. *Am Heart J* 162(4):613-619 e611.
122. Serruys PW, Garcia-Garcia HM, Buszman P, Erne P, Verheye S, Aschermann M, Duckers H, Bleie O, Dudek D, Botker HE, von Birgelen C, D'Amico D, Hutchinson T, Zambanini A, Mastik F, van Es GA, van der Steen AF, Vince DG, Ganz P, Hamm CW, Wijns W, & Zalewski A (2008) Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A(2) inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation* 118(11):1172-1182.
123. Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, & de Gaetano G (2012) Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thromb Res* 129(3):263-266.
124. Cao YJ, Wang YM, Zhang J, Zeng YJ, & Liu CF (2009) The effects of antiplatelet agents on platelet-leukocyte aggregations in patients with acute cerebral infarction. *J Thromb Thrombolysis* 27(2):233-238.
125. Izzi B, Pampuch A, Costanzo S, Vohnout B, Iacoviello L, Cerletti C, & de Gaetano G (2007) Determinants of platelet conjugate formation with polymorphonuclear leukocytes or monocytes in whole blood. *Thromb Haemost* 98(6):1276-1284.
126. Cha JK, Jeong MH, Jang JY, Bae HR, Lim YJ, Kim JS, Kim SH, & Kim JW (2003) Serial measurement of surface expressions of CD63, P-selectin and CD40 ligand on platelets in atherosclerotic ischemic stroke. A possible role of CD40 ligand on platelets in atherosclerotic ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 16(4):376-382.
127. Ritter MA, Jurk K, Schriek C, Nabavi DG, Droste DW, Kehrel BE, & Bernd Ringelstein E (2009) Microembolic signals on transcranial Doppler ultrasound are correlated with platelet activation markers, but not with platelet-leukocyte associates: a study in patients with acute stroke and in patients with asymptomatic carotid stenosis. *Neurol Res* 31(1):11-16.
128. Kinsella JA, Tobin WO, Hamilton G, & McCabe DJ (2012) Platelet activation, function, and reactivity in atherosclerotic carotid artery stenosis: a systematic review of the literature. *Int J Stroke*.
129. Hashimoto H, Kitagawa K, Kuwabara K, Hougaku H, Ohtsuki T, Matsumoto M, & Hori M (2003) Circulating adhesion molecules are correlated with ultrasonic assessment of carotid plaques. *Clin Sci (Lond)* 104(5):521-527.
130. Frijns CJ, Kappelle LJ, van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, & Fijnheer R (1997) Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke* 28(11):2214-2218.

131. Balla J, Magyar MT, Bereczki D, Valikovics A, Nagy E, Barna E, Pal A, Balla G, Csiba L, & Blasko G (2006) Serum levels of platelet released CD40 ligand are increased in early onset occlusive carotid artery disease. *Dis Markers* 22(3):133-140.
132. Zeller JA, Tschoepe D, & Kessler C (1999) Circulating platelets show increased activation in patients with acute cerebral ischemia. *Thromb Haemost* 81(3):373-377.
133. Yip HK, Lu CH, Yang CH, Chang HW, Hung WC, Cheng CI, Chen SM, & Wu CJ (2006) Levels and value of platelet activity in patients with severe internal carotid artery stenosis. *Neurology* 66(6):804-808.
134. Massot A, Pelegri D, Penalba A, Arenillas J, Boada C, Giralt D, Ribo M, Molina CA, Rosell A, Alvarez-Sabin J, Chacon P, Rovira A, Delgado P, & Montaner J (2011) Lipoprotein-associated phospholipase A2 testing usefulness among patients with symptomatic intracranial atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* 218(1):181-187.

# **Annexes**

## Annexe 1: Les interactions leucocytes-plaquettes (Figure 27)

Des interactions leuco-plaquettaires ont été rapportées dans plusieurs processus physiopathologiques liés à l'inflammation. Il apparaît de plus en plus clairement que des liens étroits existent entre le système de l'hémostase et le système immunitaire. Plusieurs protéines sont impliquées dans ces interactions.

- Interaction P-sélectine plaquettaire/PSGL1 leucocytaire

La P-sélectine qui est exprimée à la surface des plaquettes activées (à l'état basal, la P-sélectine est stockée dans les granules  $\alpha$  des plaquettes) va interagir avec le PSGL1 (P-sélectine glycoprotein ligand 1) à la surface des leucocytes pour former les agrégats leucocytes-plaquettes (1).

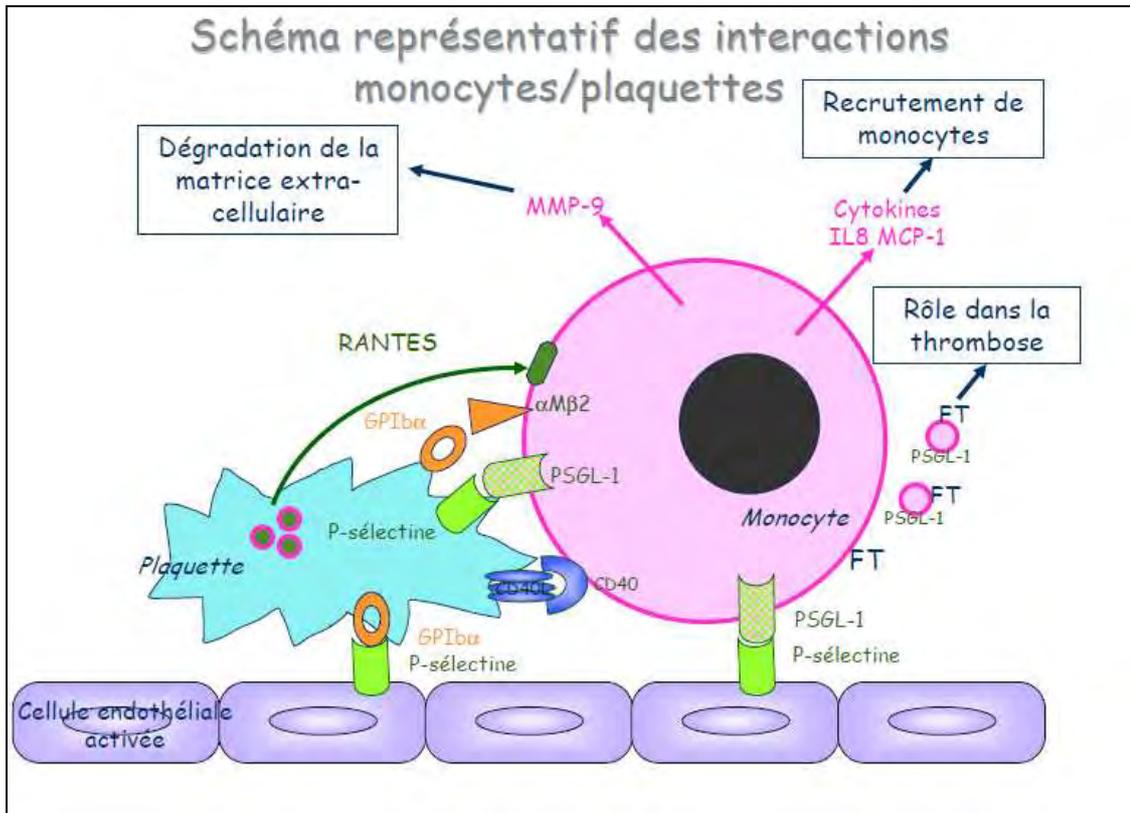
Cette interaction P-sélectine plaquettaire/PSGL1 leucocytaire va entraîner:

1. la sécrétion de RANTES (Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) et de PF4 (Platelet factor 4) par les plaquettes activées → recrutement des monocytes (2).
2. la sécrétion de chimiokines pro inflammatoires par les monocytes: MCP1 (Monocyte chemoattractant protein 1) et Il 8 (Interleukine 8) → recrutement des monocytes (3).
3. le recrutement des microparticules leucocytaires exprimant le facteur tissulaire → rôle dans la coagulation (4).
4. la sécrétion de MMP9 (Matrixmetallopeptidase9) par les monocytes → dégradation de la matrice extracellulaire → rupture de plaque et recrutement local des lymphocytes T et des macrophages (5).

- Interaction CD40 L (CD40 Ligand) plaquettaire / CD40 leucocytaire (6)

Cette interaction va entraîner :

1. la stabilisation du thrombi plaquettaire dépendante de l'intégrine  $\beta 3$  et de la plaque d'athérome
2. l'activation des monocytes (libération de MCP1, Il6, Il8, et expression de facteur tissulaire)
3. l'activation endothéliale de VCAM-1 et ICAM-1



**Figure 27 : Schéma représentatif des interactions monocytes-plaquettes.**



**Figure 28: Visualisation d'un agrégat PNN-plaquettes sur un frotté sanguin observé en microscopie optique après coloration au May-GrünwaldGiemsa**

*(Annales de Biologie Clinique Volume 68, numéro 4, Juillet-août 2010)*

1. Schober A, Manka D, von Hundelshausen P, Huo Y, Hanrath P, Sarembock IJ, Ley K, & Weber C (2002) Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation* 106(12):1523-1529.
2. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, & Ley K (2003) Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* 9(1):61-67.
3. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, & Zimmerman GA (1996) Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* 97(6):1525-1534.
4. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, & Furie B (2003) Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 197(11):1585-1598.
5. Galt SW, Lindemann S, Medd D, Allen LL, Kraiss LW, Harris ES, Prescott SM, McIntyre TM, Weyrich AS, & Zimmerman GA (2001) Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. *Circ Res* 89(6):509-516.
6. Lievens D, Eijgelaar WJ, Biessen EA, Daemen MJ, & Lutgens E (2009) The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 102(2):206-214.

## Annexe 2: Différentes voies d'activation plaquettaire

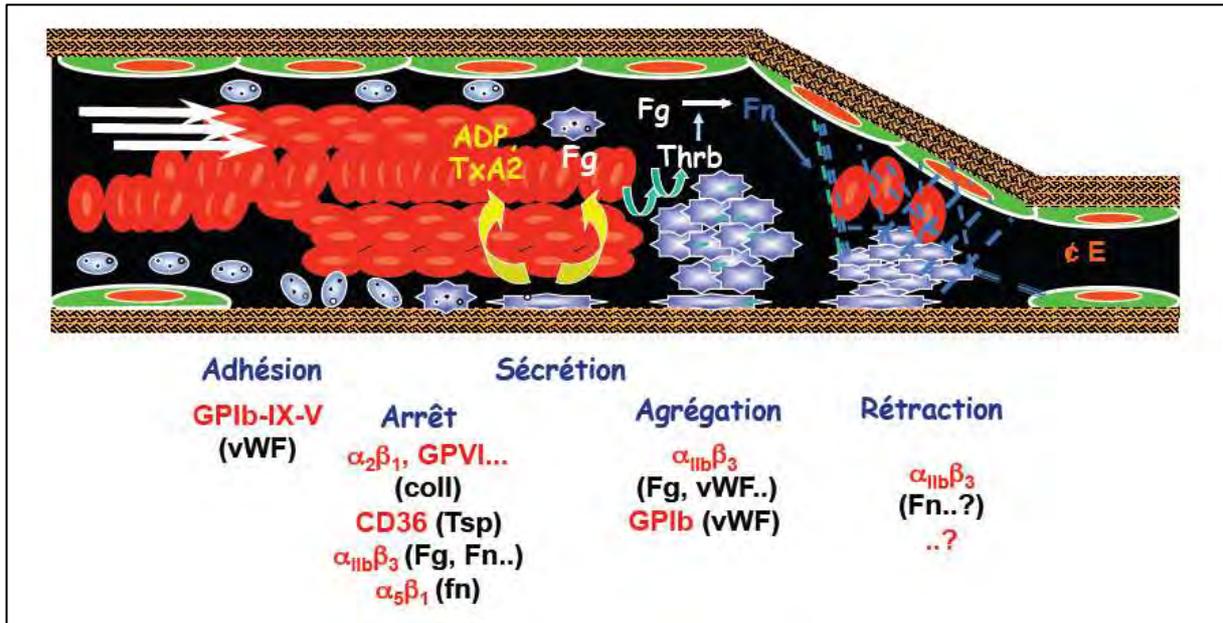
Lors d'une brèche vasculaire (mis à nu du sous endothélium), plusieurs mécanismes vont être mis en jeu pour aboutir à la formation d'un caillot (**Figure 29**):

1. Arrêt et adhésion des plaquettes au sous endothélium grâce à l'interaction entre le facteur Willebrand et le récepteur plaquettaire Gp1b-IX-V
2. Activation et étalement des plaquettes grâce à l'interaction entre le collagène de la matrice extracellulaire et les récepteurs plaquettaires  $\alpha 2\beta 1$  ou GPVI.
3. Sécrétion d'ADP et du TXA2 par les plaquettes activées
4. Agrégation plaquettaire: activation de l'intégrine  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  → interaction plaquette-plaquette par l'intermédiaire du fibrinogène → formation du thrombus
5. Mise en jeu de la cascade de coagulation avec production de thrombine → transformation du fibrinogène en fibrine → caillot
6. Rétraction du caillot

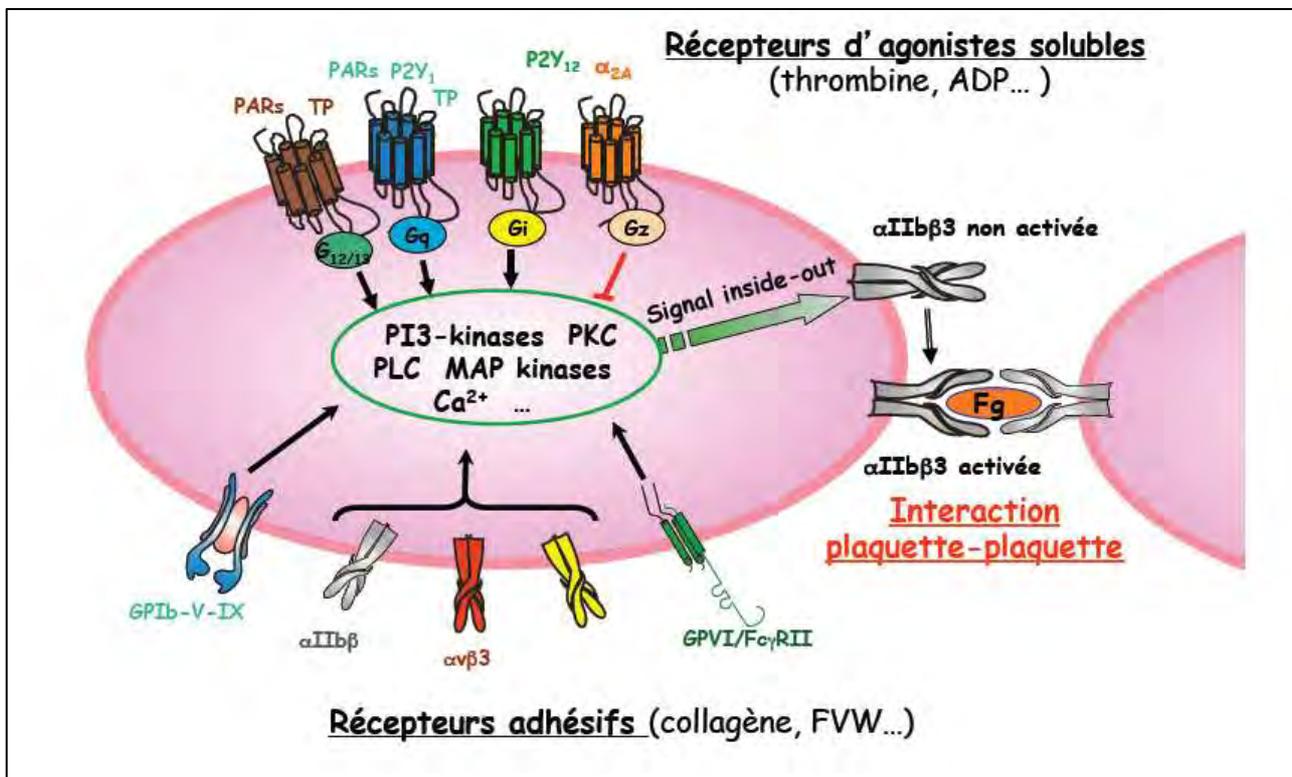
Toutes ces étapes de l'activation plaquettaire impliquent différents types de récepteurs (**Figure 30**):

- des récepteurs aux molécules adhésives: le récepteur Gp1b-IX-V du facteur de Willebrand, les récepteurs  $\alpha 2\beta 1$  ou GPVI du collagène, l'intégrine  $\alpha \text{IIb}\beta 3$ .
- des récepteurs aux agonistes solubles: le récepteur P2Y1 ou P2Y12 de l'ADP, le récepteur TP du TXA2 ou le récepteur PAR1 de la thrombine.

L'activation de ces récepteurs entraîne des mécanismes de signalisation cellulaire hautement régulés. Certaines de ces voies de signalisation (celles étudiées dans ce travail) vont être détaillées ci-dessous.



**Figure 29 : Les différentes étapes de l'activation plaquettaire lors de la formation d'un thrombus plaquettaire.**

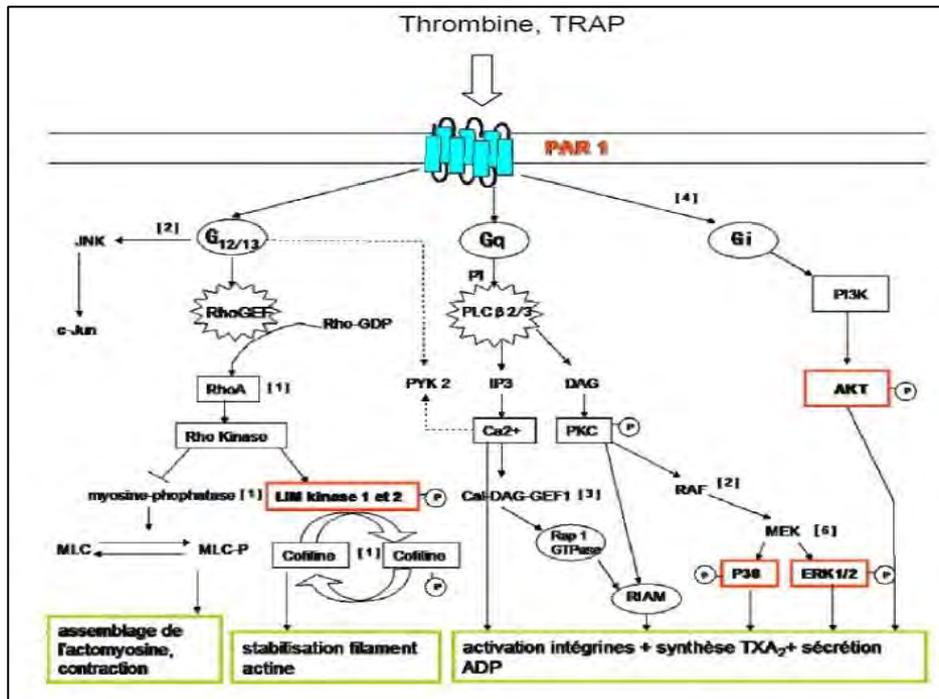


**Figure 30 : Les différents récepteurs intervenant dans l'activation plaquettaire.**

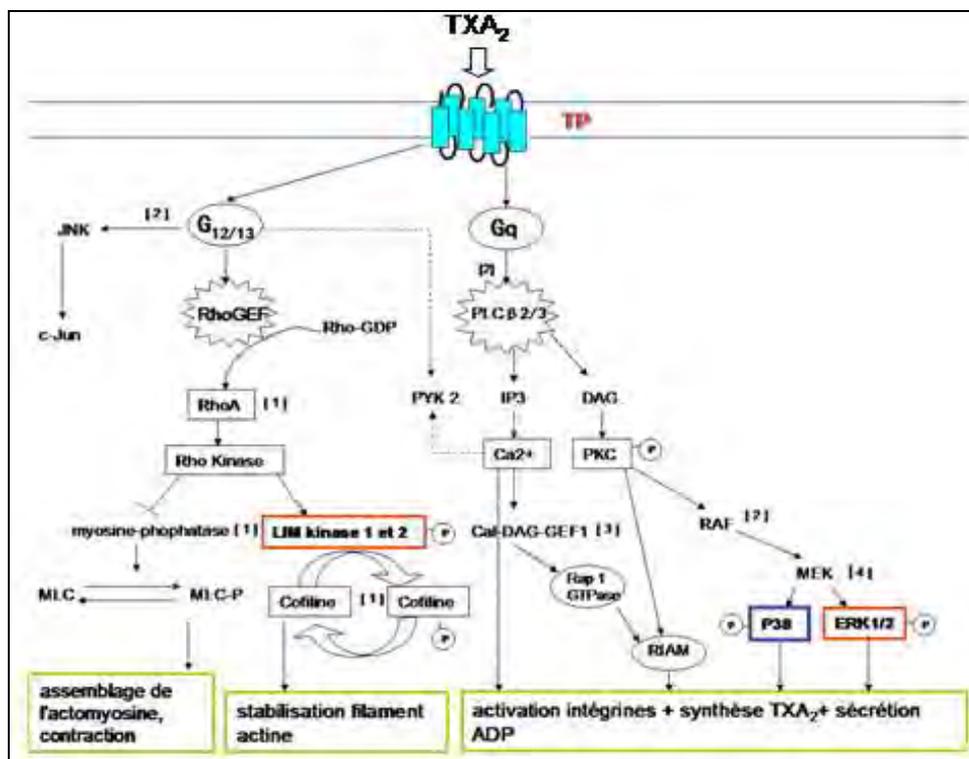
- **Récepteur PAR1 à la thrombine, récepteur TP au TXA2 et récepteur P2Y12 à l'ADP**

Le récepteur PAR1 à la thrombine (**Figure 31**), le récepteur TP au TXA2 (**Figure 32**) et le récepteur P2Y12 à l'ADP (**Figure 33**) sont tous des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G hétérotrimérique (appartenant à la famille des GTPases) (1). Selon le type de récepteur, différentes protéines G vont être activées:

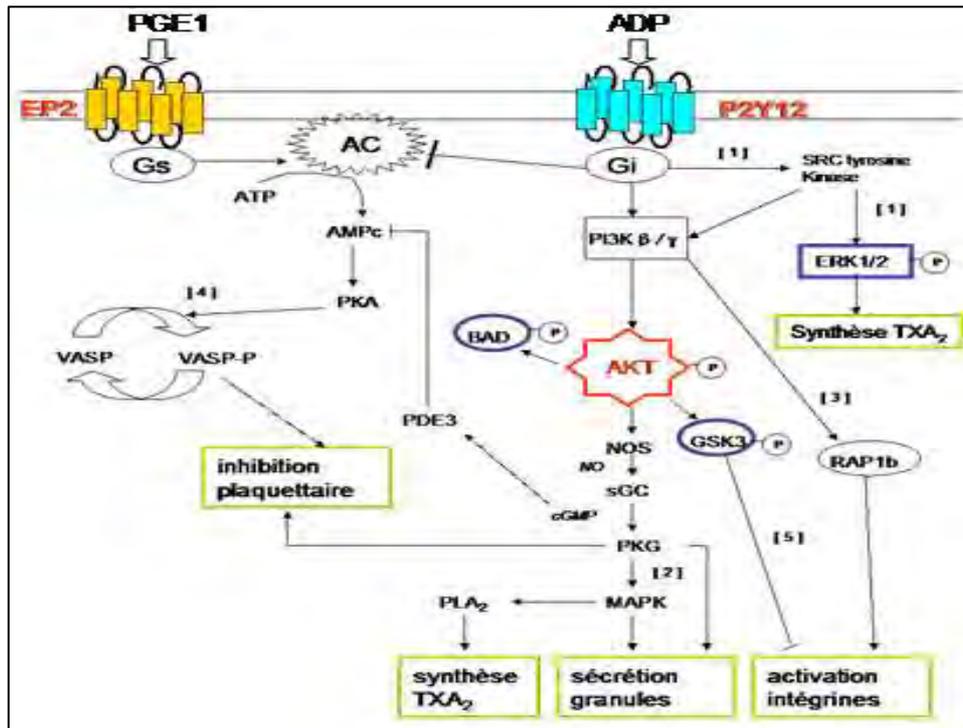
1. la protéine Gi → activation des PI3 kinases → phosphorylation de la protéine AKT → activation de l'intégrine  $\alpha$ Ib $\beta$ 3, synthèse de TXA2 et sécrétion d'ADP
2. la protéine Gq → activation de la PLC $\beta$  2/3 → hydrolyse du PI(4,5)P2 → formation de IP3 et DAG. IP3 → libération de calcium intra-cellulaire et DAG → activation de PKC → phosphorylation de P38 → activation de l'intégrine  $\alpha$ Ib $\beta$ 3, synthèse de TXA2 et sécrétion d'ADP
3. la protéine G12/13 → activation des GTPase de la famille Rho et des Rho kinases → phosphorylation de LIM-kinase 1 et 2 → stabilisation des filaments d'actine  
→ inhibition de la myosine phosphatase → assemblage de l'actomyosine et contraction.



**Figure 31 : Représentation schématique de la signalisation induite par le récepteur PAR1**



**Figure 32 : Représentation schématique de la signalisation induite par le récepteur TP**



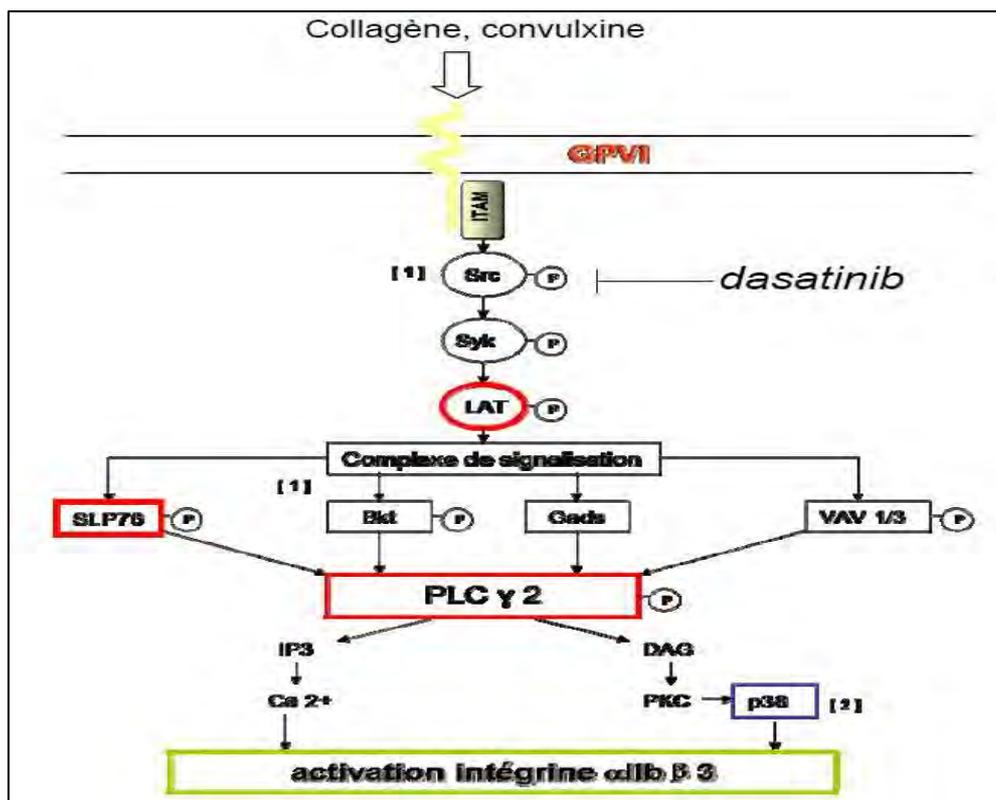
**Figure 33 : Représentation schématique de la signalisation induite par le récepteur P2Y12**

- Récepteur GPVI au collagène

Le récepteur au collagène GPVI appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Il est associé à la chaîne  $\gamma$  du récepteur aux fragments constants des immunoglobulines (FcR $\gamma$ ) qui porte un motif ITAM. Une cascade de réaction va se produire après la liaison du collagène à ce récepteur (2) (**Figure 34**):

1. Activation des kinases de la famille des Src (Fyn, Lyn)  $\rightarrow$  phosphorylation des deux tyrosines du motif ITAM de la chaîne gamma associée à GPVI
2. Recrutement et activation de la tyrosine kinase Syk par ses domaines SH2  $\rightarrow$  phosphorylation des protéines adaptatrices LAT ou SLP76
3. Assemblage d'un complexe de signalisation  $\rightarrow$  phosphorylation de PLC $\gamma$ 2 par Syk et d'autres tyrosine kinases de la famille Src (Lyn, Fyn, Yes) ou Tec (Tec et Btk)

4. Relocalisation et stabilisation de la PLC $\gamma$ 2 à la membrane plasmique grâce au PIP $_3$  (un des produits de la PI3K)  $\rightarrow$  hydrolyse du PI(4,5)P $_2$   $\rightarrow$  formation de IP3 et DAG.
5. IP3  $\rightarrow$  libération de calcium intracellulaire et DAG  $\rightarrow$  activation de PKC  $\rightarrow$  phosphorylation de P38
6. Activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3



**Figure 34 : Représentation schématique de la signalisation induite par le récepteur GPVI**

1. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, & Du X (2010) Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(12):2341-2349.
2. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, & Pearce AC (2005) GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 3(8):1752-1762.

## **Annexe 3: Score NIHSS**

(Brott et al. (2010) Stenting versus endarterectomy for treatment of carotid-artery stenosis. N Engl J Med 363(1):11-23)

### **Niveau de conscience**

- ▶ 0 = vigilance normale, réponses aisées
- ▶ 1 = non vigilant, éveillable par des stimulations mineures pour répondre ou exécuter les consignes
- ▶ 2 = non vigilant, requiert des stimulations répétées pour maintenir son attention ; ou bien est obnubilé et requiert des stimulations intenses ou douloureuses pour effectuer des mouvements autres que stéréotypés
- ▶ 3 = répond seulement de façon réflexe, motrice ou autonome; ou totalement aréactif, flasque et aréflexique

### **QUESTIONS**

Le patient est questionné sur le mois et son âge :

- ▶ 0 = réponses correctes aux deux questions
- ▶ 1 = réponse correcte à une question
- ▶ 2 = aucune réponse correcte

### **CONSIGNES**

Le patient doit ouvrir et fermer les yeux puis serrer et relâcher la main non parétique :

- ▶ 0 = exécute les deux tâches correctement
- ▶ 1 = exécute une tâche correctement
- ▶ 2 = n'exécute aucune tâche correctement

### **Oculomotricité**

- ▶ 0 = normal
- ▶ 1 = paralysie oculomotrice partielle. Score donné quand le regard est anormal sur un œil ou sur les deux, sans déviation forcée du regard ni paralysie complète
- ▶ 2 = déviation forcée ou paralysie complète non surmontée par les réflexes oculo-céphaliques

### **Vision**

- ▶ 0 = normal
- ▶ 1 = hémianopsie partielle
- ▶ 2 = hémianopsie complète
- ▶ 3 = double hémianopsie (incluant cécité corticale)

### **Paralysie faciale**

- ▶ 0 = mouvement normal et symétrique
- ▶ 1 = paralysie mineure (affaissement du sillon nasogénien, asymétrie du sourire)
- ▶ 2 = paralysie partielle (paralysie complète ou presque de l'hémiface inférieure)
- ▶ 3 = paralysie complète d'un ou des deux côtés

### **Ataxie des membres**

La cotation est effectuée aux quatre membres :

- ▶ 0 = absente
- ▶ 1 = présente sur un membre
- ▶ 2 = présente sur deux membres

### **Motricité des membres**

La cotation est effectuée aux quatre membres :

membres supérieurs droit : gauche :

- ▶ 0 = pas de chute, bras tenus à 90° (ou 45° en décubitus) pendant 10 secondes
  - ▶ 1 = chute, le bras tenu à 90 ou 45°, chute vers le bas avant 10 secondes, sans heurter le lit ou un autre support
  - ▶ 2 = effort contre la pesanteur possible, mais le bras ne peut atteindre ou maintenir la position à 90° ou 45°, et tombe sur le lit
  - ▶ 3 = aucun effort contre la pesanteur, le membre tombe
  - ▶ 9 = aucun mouvement (amputation, arthrodèse, expliquer la raison de cette cotation)
- membres inférieurs droit : gauche :
- ▶ 0 = pas de chute, jambes tendues à 30° pendant 5 secondes
  - ▶ 1 = chute, les jambes tombent avant 5 secondes mais ne heurtent pas le lit
  - ▶ 2 = effort contre la pesanteur, les jambes tombent dans les 5 secondes
  - ▶ 3 = pas d'effort contre la gravité, les jambes tombent sur le lit immédiatement
  - ▶ 4 = pas de mouvement
  - ▶ 9 = aucun mouvement (amputation, arthrodèse, expliquer la raison de cette cotation)

### **Sensibilité**

- ▶ 0 = normal, pas de déficit sensitif
- ▶ 1 = hypoesthésie minimale à modérée: le patient sent que la piqûre est moins nette ou atténuée du côté atteint; ou bien il n'y a pas de sensation douloureuse à la piqûre, mais le patient est conscient d'être touché.
- ▶ 2 = hypoesthésie sévère ou anesthésie: le patient n'est pas conscient d'être touché sur la face, le bras et la jambe

### **Langage**

- ▶ 0 = pas d'aphasie, langage normal
- ▶ 1 = aphasie minimale à modérée : perte de fluence ou difficulté de compréhension, sans limitation des idées exprimées ni de la forme de l'expression. La réduction du discours ou de la compréhension rend cependant la conversation, à partir de thèmes imposés par l'examineur, difficile voire impossible. L'examineur peut identifier des images à partir des réponses du patient
- ▶ 2 = aphasie sévère : l'expression est fragmentaire. Des interférences, des questions et des déductions sont sans cesse nécessaires de la part de l'examineur. L'étendue des informations échangées est limitée ; l'examineur supporte tout le poids de la conversation. Il ne peut identifier les objets dénommés à partir des réponses du patient.
- ▶ 3 = mutique, aphasie globale : pas de langage utile ni de compréhension du langage oral

### **Dysarthrie**

- ▶ 0 = normal
- ▶ 1 = minimale à modérée : le patient bute sur certains mots et, au pire, est compris avec quelques difficultés
- ▶ 2 = sévère : le discours est si perturbé qu'il est incompréhensible, sans proportion avec une éventuelle aphasie ou en l'absence de celle-ci ; ou bien le patient est mutique-anarthrique
- ▶ 9 = patient intubé ou autre barrière physique, expliquer la raison de cette cotation

### **Extinction et négligence**

- ▶ 0 = pas d'anomalie
- ▶ 1 = négligence ou extinction visuelle, tactile, auditive, ou personnelle aux stimulations bilatérales simultanées dans l'une des modalités sensorielles
- ▶ 2 = hémignégligence sévère ou extinction dans plusieurs modalités sensorielles. Ne reconnaît pas sa propre main ou s'oriente vers un seul hémispace

## **Annexe 4 : Fiche d'information remise au patient**

### **FICHE D'INFORMATION**

**Titre de la recherche : Recherche d'une corrélation entre la concentration plasmatique de la lipoprotéine associée à la phospholipase A2 et la présence de signaux microemboliques au doppler transcrânien chez des patients ayant une sténose carotidienne athéromateuse récemment symptomatique.**

**Investigateurs : Pr Vincent Larrue, Dr Nathalie Nasr, Mme Line Cuinat (service de Neurologie Vasculaire), Dr Françoise Maupas-Schwalm, Pr Robert Salvayre (laboratoire de Biochimie), Pr Bernard Payrastre (Unité Inserm 1048)**

**Hôpital Rangueil, Université de Toulouse 3, INSERM U1048**

**Madame, Monsieur,**

Les informations ci-dessous concernent l'étude à laquelle vous êtes invité(e) à participer. Elles sont destinées à faciliter votre décision d'y participer ou non. Lisez-les attentivement avant de prendre votre décision. Le médecin responsable de l'étude discutera avec vous de ces informations, mais il est important que vous lui demandiez des explications sur tout ce qui ne vous semble pas clair.

#### **Quel est le but de cette recherche ?**

Nous espérons montrer qu'une valeur élevée de l'activité de la Lipoprotéine associée à la phospholipase A2 (Lp-PLA2) (marqueur inflammatoire) est corrélée à la présence de signaux microemboliques chez les patients ayant une sténose de la carotide récemment symptomatique. Les patients ayant présenté un accident ischémique transitoire ou un accident ischémique constitué lié à une sténose carotidienne ont un risque élevé de récurrence ischémique. Le facteur prédictif de récurrence précoce le plus puissant est la présence de signaux microemboliques en aval de la sténose. Les signaux microemboliques correspondent au passage de microparticules circulantes prenant naissance de la plaque carotidienne. Nous ne connaissons pas leur composition exacte. Ces signaux microemboliques sont recherchés par un monitoring du doppler transcrânien en continu sur l'artère cérébrale moyenne. La réduction de ces signaux microemboliques par une thérapeutique antiagrégante plaquettaire renforcée diminue le risque de récurrence précoce. La recherche de signaux microemboliques ne peut être réalisée dans tous les centres qui prennent en charge les accidents vasculaires cérébraux car elle est coûteuse en temps et ne peut être réalisée que par des opérateurs expérimentés. Si nous démontrons une forte corrélation entre le taux de Lp-PLA2 et la présence de signaux microemboliques, le dosage de la Lp-PLA2 pourrait être utilisé en

pratique quotidienne pour identifier plus facilement les patients à risque de récurrence ischémique précoce. Cela pourrait permettre d'adapter le traitement antiagrégant plaquettaire dans les centres où les signaux microemboliques ne peuvent être recherchés.

Parallèlement à cette étude, nous voudrions essayer de rechercher à quoi correspondent ces signaux microemboliques. Nous pensons qu'ils peuvent être constitués d'agrégats leucocytes-plaquettes ou d'agrégats plaquettaires. Nous pensons que l'activation plaquettaire est indispensable à leur formation. Le fait de connaître la voie d'activation plaquettaire impliquée dans leur formation pourrait avoir un impact thérapeutique intéressant en inhibant préférentiellement la voie concernée.

### **Comment se déroule cette étude ?**

La prise en charge classique d'un patient hospitalisé dans le service de neurologie vasculaire du Pr Larrue pour un accident vasculaire ischémique cérébral (accident ischémique transitoire ou accident ischémique constitué) se déroule de la façon suivante :

- Interrogatoire et examen clinique : recueil des antécédents médicaux, des facteurs de risques cardio-vasculaires, des traitements en cours, description du déficit neurologique
- Réalisation d'un bilan biologique avec recherche des facteurs de risque cardio-vasculaires (HbA1C, bilan lipidique, Lp(a)),
- Réalisation d'un électrocardiogramme
- Réalisation d'une imagerie cérébrale (si possible une IRM cérébrale) avec des séquences angiographiques,
- Réalisation d'une échographie- doppler carotidienne et transcrânienne,

Si l'étiologie probable de l'accident ischémique transitoire ou de l'accident ischémique constitué est une sténose carotidienne, une recherche de signaux microemboliques est réalisée. Si celle-ci est positive, le traitement antiagrégant plaquettaire est renforcé. Une deuxième recherche de signaux microemboliques est alors réalisée pour vérifier si ces signaux ont disparu.

Ensuite, l'indication du traitement de la sténose carotidienne par endartériectomie ou angioplastie est discutée. Lorsque l'indication est retenue, le traitement sera effectué aussi tôt que possible, en fonction de l'importance de la lésion cérébrale ischémique révélatrice.

Dans notre étude, la prise en charge sera identique. Par contre, nous prélèverons deux tubes sanguins supplémentaires afin de doser l'activité de la LpPLA2, le taux d'agrégats leucocytes-plaquettaires, et le taux de phosphorylation des protéines impliquées dans l'activation plaquettaire.

La contrainte liée à l'étude est :

-le prélèvement de deux tubes sanguins supplémentaires pour le dosage de l'activité de la LpPLA2, du taux d'agrégats leuco-plaquettaires et du taux de phosphorylation des protéines impliquées dans l'activation plaquettaire.

Risques prévisibles: cette étude ne présente pas de risque prévisible significatif.

Il n'y aura aucun frais lié à la participation à cette étude.

Votre refus éventuel de participer à l'étude n'aura pas de conséquence sur votre prise en charge médicale. Si vous décidez d'interrompre votre participation à l'étude, vous serez libre de le faire à tout moment sans que cela n'affecte votre prise en charge médicale.

Vous serez informé des résultats globaux de la recherche à la fin de l'étude. Les résultats vous seront communiqués par courrier, directement ou par l'intermédiaire du médecin de votre choix (*Loi du 4 mars 2002 relative aux Droits des malades*).

Le médecin coordinateur de l'étude (le professeur Vincent Larrue, n° de téléphone: 0561322641) est à votre disposition pour vous apporter toutes les précisions complémentaires que vous souhaitez.

Après un délai de réflexion que vous jugerez suffisant, vous pourrez librement signer le formulaire de consentement en double exemplaire dont vous conserverez un exemplaire. Vous garderez également une copie de la fiche d'information dont vous aurez paraphé chaque page.

## **Annexe 5: Fiche de consentement libre et éclairé signé par les patients**

**Recherche d'une corrélation entre la concentration plasmatique de la lipoprotéine associée à la phospholipase A2 et la présence de signaux microemboliques au doppler transcrânien chez des patients ayant une sténose carotidienne athéromateuse récemment symptomatique.**

### **FORMULAIRE DE CONSENTEMENT LIBRE ET ECLAIRE**

Lire avec attention les différentes parties de ce document. Êtes-vous sûr(e) que toutes les questions que vous vous êtes posées ont eu une réponse ?

Ne signez ce consentement qu'après avoir lu toutes les parties. Vous signerez ce formulaire de consentement en double exemplaire, dont vous conserverez un exemplaire.

Nom du sujet : .....Prénom du sujet :.....

Né(e) le.....

Adresse:

.....

Numéro de téléphone : .....

*Numéro de sécurité sociale* :.....

1. J'accepte de participer à l'étude suivante : « Etude de la corrélation entre la concentration plasmatique de la lipoprotéine associée à la phospholipase A2 et la présence de signaux microemboliques au doppler transcrânien chez des patients ayant une sténose carotidienne athéromateuse récemment symptomatique ».

Je sais que l'étude consistera, en complément de la prise en charge classique des sténoses carotidiennes récemment symptomatiques, en un dosage sanguin de l'activité de la lipoprotéine associée à la phospholipase A2, du taux d'agrégats leucocytes-plaquettes, du taux de phosphorylation des protéines impliquées dans l'activation plaquettaire.

J'ai été informé(e) du but de cette expérimentation, de sa méthodologie et de sa durée, du fait qu'il s'agit d'une recherche sans bénéfice individuel direct. Les risques prévisibles m'ont été expliqués. Il n'y aura aucun frais concernant ma participation à cette étude. J'ai reçu également une information écrite sur ce point qui me semble suffisante pour m'éclairer valablement.

2. Je sais que le Comité d'éthique de l'hôpital CHU Rangueil a donné un avis favorable pour la réalisation de cette étude en date du 17 mai 2011.

3. J'ai donné mon consentement libre et éclairé. Je déclare en outre avoir donné toutes les informations : sur toute maladie ou traitement me concernant.

4. Ma participation est totalement volontaire ; je suis libre de ne pas accepter ou de retirer mon accord de participation à tout moment de l'étude si bon me semble sans avoir à en préciser les raisons.

5. J'accepte que les données obtenues au cours de cette étude soient publiées. Il est entendu que mon nom ne figurera dans aucun rapport ou article concernant cet essai. Les informations médicales recueillies dans cette étude seront traitées confidentiellement. De même, les données enregistrées à l'occasion de cette étude et qui feront l'objet d'un traitement informatisé par l'investigateur resteront strictement confidentielles. Leur consultation n'est autorisée que par les responsables de l'étude et par un représentant des autorités de santé. Je bénéficie à tout moment d'un droit d'accès et de rectification des données me concernant conformément aux dispositions légales en vigueur. Ce droit pourra être directement exercé par moi ou par l'intermédiaire d'un médecin de mon choix.

6. Les résultats globaux de la recherche me seront communiqués à la fin de l'étude (loi 4 mars 2002 relative aux droits des malades).

7. J'ai eu la possibilité de poser toutes les questions que je me posais quant à cette étude et j'ai bien reçu une réponse à chacune des questions.

8. J'accepte librement de participer à cette recherche dans les conditions précisées dans la notice d'information.

9. J'atteste ne pas être sous sauvegarde de justice, tutelle ou curatelle.

Fait à Toulouse en deux exemplaires le ..... / ..... / .....

Signature du patient

Signature de l'investigateur

## Annexe 6 : Avis du comité d'éthique



COMITE D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE

Toulouse, le 19 Mai 2011

A l'attention de

Monsieur le Professeur Vincent Larrue

Lors de la séance du 17 Mai 2011, le comité d'éthique de la recherche des Hôpitaux de Toulouse a examiné le projet (n° 15 - 0511) intitulé : «**Etude de la corrélation entre la concentration plasmatique de la lipoprotéine associée à la phospholipase A2 et la présence de signaux microemboliques au doppler transcrânien chez des patients ayant une sténose carotidienne athéromateuse récemment symptomatique**», que vous lui avez soumis en tant qu'investigateur.

Etaient présents: Dr Jean Marie CONIL, Christian CAZOTTES, Dr Marie Elise LLAU, Pr Olivier FOURCADE, Dr Françoise LORENZINI, Mme Marie-Claude VALLEJO.

Après examen du dossier et des modifications demandées le **comité émet un avis favorable à la mise en oeuvre de cette recherche.**

Je vous prie d'agréer, Monsieur, l'assurance de ma considération distinguée.

**Dr Jean-Marie CONIL**

*Président du Comité d'Ethique de la Recherche des Hôpitaux de Toulouse*

*PH - Service de Réanimation - Hôpital de Rangueil*

*GRCB 48, IFR 150 Hôpital Rangueil*

05 61 32 24 86 ou 05 61 32 27 91

conil.jm@chu-toulouse.fr

Title: Recently symptomatic atherosclerotic carotid stenosis: in search of markers of inflammation and platelet activation

---

Abstract: Microembolics signals (MES) are the most potent marker associated with early recurrence after stroke due to atherosclerotic carotid stenosis. The main objective of our study was to find a correlation between enzyme activity of lipoprotein associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) and the presence of MES. The secondary objective was to understand better the pathophysiology of these MES searching an association with leukocytes-platelets aggregates and analyzing platelet activation pathways. Patients with symptomatic carotid stenosis ( $\geq 50\%$ ) had a transcranial Doppler monitoring for 30 minutes for the detection of MES. The enzymatic activity of Lp-PLA2 was measured with an automated specific kit PLAC ® Test. Monocyte-platelet aggregates and neutrophil-platelet aggregates as well as phosphorylation of proteins involved in the platelet activation pathways (AKT, P38, SLP76) were analyzed by flow cytometry. The average value of the enzymatic activity of Lp-PLA2 was not statistically significantly associated with the presence of MES ( $p= 0.74$ ) in 47 patients (34 MES- and 13 MES +). There was no statistically significant difference in the percentage of monocyte-platelet aggregates ( $p= 0.86$ ) and neutrophil-platelet aggregates ( $p= 0.24$ ) between patients MES- and MES + in 29 patients (22 MES- and 7 MES +). There was no significant difference between the basal level of protein phosphorylation (AKT, P38 and SLP76) between patients (19 MES- and 3 MES +) and controls. Our study does not suggest that Lp-PLA2 is a relevant marker of risk of recurrent stroke in the short term. The analysis of leukocytes-platelets aggregates and platelet activation pathways involved in patients with stroke, compared to controls, allow us to address the complex pathophysiology of MES. It might be a thrombotic origin to the early phase of stroke, sensitive to anti-coagulant.

---

## **Sténose carotidienne athéromateuse récemment symptomatique : à la recherche de marqueurs de l'inflammation et d'activation plaquettaire**

---

Les signaux microemboliques (MES) représentent le facteur de récurrence précoce le plus puissant après un accident vasculaire cérébral (AVC) lié à une sténose carotidienne athéromateuse. L'objectif principal de notre étude est de rechercher une corrélation entre le taux d'activité enzymatique de la lipoprotéine associée à la phospholipase A2 (Lp-PLA2) et la présence de MES. L'objectif secondaire est d'appréhender la physiopathologie de ces MES en recherchant une association avec les agrégats leuco-plaquettaires et en analysant les voies d'activation plaquettaire. Les patients avec une sténose carotidienne ( $\geq 50\%$ ) symptomatique ont bénéficié d'un monitoring du doppler transcrânien en continu pendant 30 minutes pour la recherche de MES. L'activité enzymatique de la Lp-PLA2 a été mesurée de façon automatisée avec un kit de dosage spécifique PLAC Test<sup>®</sup>. Les agrégats monocytes-plaquettes et polynucléaires neutrophiles-plaquettes et la phosphorylation des protéines impliquées dans les voies d'activation intra-plaquettaire (AKT, P38, SLP76) ont été analysés en cytométrie de flux. La valeur moyenne de la Lp-PLA2 n'était pas statistiquement associée à la présence de MES ( $p= 0,74$ ) chez les 47 patients inclus (34 MES- et 13 MES+). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative du pourcentage d'agrégats monocytes-plaquettes ( $p= 0,86$ ) et PNN-plaquettes ( $p= 0,24$ ) entre les patients MES- et MES+ chez 29 patients analysés (22 MES- et 7 MES+). Il n'y avait pas de différence significative entre le taux de phosphorylation des protéines AKT, P38 et SLP76 entre les patients (19 MES- et 3 MES+) et les témoins. Notre étude ne permet pas de conclure que la Lp-PLA2 est un marqueur pertinent du risque de récurrence d'AVC à court terme. L'analyse des agrégats leuco-plaquettaires ainsi que l'étude des voies de signalisation plaquettaires impliquées chez les patients ayant présenté un AVC, comparativement à des témoins, nous permettent d'aborder la physiopathologie, complexe, des MES. Leur origine pourrait être thrombotique à la phase très précoce de l'accident neurologique et sensible au traitement anticoagulant.

---

TITRE EN ANGLAIS: Recently symptomatic atherosclerotic carotid stenosis: in search of markers of inflammation and platelet activation

---

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée clinique

---

MOTS-CLES : Accidents vasculaires cérébraux, sténose athéromateuse carotidienne, signaux microemboliques, lipoprotéine associée à la phospholipase A2, agrégats leucocytes-plaquettes, voies d'activation plaquettaire

---

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Toulouse III-Paul Sabatier

Faculté de médecine Toulouse-Purpan, 35 Allées Jules Guesde BP 7202 31073 Toulouse Cedex 7

---

Directrice de thèse : Dr MAUPAS-SCHWALM Françoise