Journal des Maladies Vasculaires (Paris)
© Masson, 2000, *25*, 5, 349-355

ASPECTS HÉMORHÉOLOGIQUES DE L'ACTIVATION LEUCOPLAQUETTAIRE DANS LES PATHOLOGIES ATHÉROMATEUSES

Applications cliniques

J.-F. BRUN (1), C. BOUCHAHDA (1), A. AISSA-BENHADDAD (1), C. SAGNES (1), M.-C. GRANAT (1), M. BOR KUÇUKATAY (2), O. BASKÜRT (2), J. MERCIER (1)

(1) Service Central de Physiologie Clinique, Centre d'Exploration et de Réadaptation des Anomalies du Métabolisme Musculaire (CERAMM), CHU de Montpellier, 34295 Montpellier Cedex 5, France.
(2) Physiology Department of Medical Faculty, Akdeniz University, Turquie.

RÉSUMÉ :

Aspects hémorhéologiques de l'activation leucoplaquettaire dans les pathologies athéromateuses : applications cliniques.

L'athérosclérose (et son évolution vers les accidents thrombotiques) est désormais interprétée comme une maladie inflammatoire dans laquelle l'interaction entre endothélium, leucocytes et plaquettes joue un rôle déterminant. Les études épidémiologiques à grande échelle n'apprécient cependant l'activation leucocytaire qu'indirectement, à l'aide de marqueurs un peu simplistes tels que l'élastase ou la numération leucocytaire, mais ces marqueurs semblent être des prédicteurs indépendants d'ischémie en aval de la lésion athéromateuse. Cette activation leucocytaire est généralement associée à des perturbations hémorhéologiques plus classiques, portant sur la viscosité sanguine et le fibrinogène, qui apparaissent eux aussi à l'analyse multivariée comme des déterminants des lésions athéromateuses et de leurs conséquences ischémiques et thrombotiques, statistiquement indépendants des « facteurs de risque classiques ». Il est probable que l'activation leucocytaire joue un rôle important dans ces perturbations hémorhéologiques, car celle-ci s'accompagne de la production par le leucocyte de molécules (enzymes protéolytiques, radicaux libres, cytokines...) susceptibles d'affecter le globule rouge, le rendant plus agrégable et plus rigide, et augmentant la production de fibrinogène. Ces interactions sont imparfaitement comprises actuellement, comme le montre le rôle encore difficile à cerner du NO qui a selon les conditions expérimentales des effets antiathérogènes ou proathérogènes. La production par le leucocyte de substances entraînant une hyperviscosité est amplifiée par l'hypoxie, tandis que l'amélioration du périmètre de marche lors des claudications intermittentes s'accompagne d'une réduction conjointe des facteurs « classiques » de la viscosité et de l'activation leucocytaire. Tout cela porte à penser que l'activation leucocytaire et l'hyperviscosité sont deux phénomènes étroitement interdépendants dans la maladie athéromateuse, et que, malgré la complexité de ces interactions, des marqueurs biologiques relativement simples et abordables de ce processus pourront peu à peu être proposés au clinicien. (J Mal Vasc 2000 ; 25 : 349-355)

Mots-clés : Hémorhéologie. Leucocyte. Agrégation érythrocytaire. Viscosité sanguine. NO.

ABSTRACT :

Hemorheological aspects of leuko-platelet activation in atheromatous diseases: clinical applications.

Atherosclerosis (and its evolution towards thrombotic accidents) is now considered to be an inflammatory disease in which the interaction among endothelium, leukocytes and platelets plays a determining role. However, large scale epidemiological studies only indirectly reveal the leukocyte activation through somewhat simplistic markers, such as elastase or leukocyte counts. Interestingly, these markers seem to be independent predictors of ischemia distal to the atheromatous lesion. This leukocyte activation is usually associated with more classical hemorheological disturbances affecting blood viscosity and fibrinogen which, on multivariate analysis, also appear to be determinants of atheromatous lesions and their ischemic and thrombotic consequences, statistically independent of the "classical risk factors". Leukocyte activation probably plays an important role in these hemorheological disturbances, because it is associated with the production of leukocyte secretory products (proteolytic enzymes, free radicals, cytokines) which can alter the red cells and make them more aggregable and more rigid, and can increase the production of fibrinogen. These interactions remain uncompletely understood, as illustrated by the still unclear role of NO which, depending on the experimental conditions, can have antiatherogenic or proatherogenic effects. The production by the leukocyte of substances leading to hyperviscosity is amplified by hypoxia, while the improvement in claudication distance resulting from walking exercise is associated with a joint fall of the "classical" factors of viscosity and of leukocyte activation markers. All this suggests that leukocyte activation and hyperviscosity are closely interdependent phenomena in the course of atheromatous disease and that, despite the complexity of these interactions, relatively simple and reasonably priced biological markers of this process will become available to the clinician. (J Mal Vasc 2000; 25: 349-355)

Key-words : Hemorheology. Leukocyte. Red cell aggregation. Blood viscosity. NO.

Du fait de l'importance des paramètres lipidiques dans sa pathogénie, l'athérosclérose a été longtemps comprise comme résultant principalement d'une accumulation excessive de cholestérol dans la paroi vasculaire. Notre compréhension de ce processus s'est fortement affinée depuis une décennie. Il est désormais évident que le facteur lipidique, quoique son importance soit amplement confirmée par de récentes études interventionnelles utilisant les nouveaux hypolipémiants (1), n'explique pas tout. L'athérosclérose doit en fait être désormais interprétée comme une véritable maladie inflammatoire (2), dans laquelle l'interaction entre endothélium, leucocytes et plaquettes joue un rôle déterminant (3).

L'ATHÉROSCLÉROSE : UNE MALADIE INFLAMMATOIRE DONT LE LEUCOCYTE EST UN AGENT MAJEUR

Rappelons brièvement que, lors de toute réaction inflammatoire, la réponse de la paroi vasculaire est très précoce (4) se traduisant par une activation des cellules endothéliales, des modifications de la réactivité vasomotrice, un accroissement de la perméabilité vasculaire. Simultanément, les leucocytes neutrophiles et polynucléaires sont activés, contribuant à la mise en place d'une réponse systémique avec augmentation des concentrations circulantes de protéines de l'inflammation (fibrinogène). Cette réponse systémique, comme nous le verrons plus bas, produit une augmentation de la viscosité sanguine par élévation de la viscosité plasmatique, de l'agrégation des hématies, et de la rigidité des hématies. Les leucocytes polynucléaires vont migrer du centre vers la périphérie de la lumière des vaisseaux, notamment des veinules, migration favorisée par la formation de rouleaux d'hématies (effet Fahraeus-Vejlens) (5). Les premières étapes de la réaction inflammatoire ont produit des médiateurs (thrombine, LPS, leucotriène B4, Interleukine 1, TNF) qui conduisent à l'arrêt-roulement des leucocytes sur l'endothélium (*rolling*). Ce mécanisme est lié à l'expression de sélectines. Une deuxième étape est l'adhésion ferme des leucocytes sur l'endothélium suite à l'expression sur le leucocyte d'intégrines, dont les ligands sur l'endothélium activé sont ICAM1 et 2, VCAM-1, MadCAM-1. Etape suivie de la migration transendothéliale. Le granulocyte activé qui entreprend ce parcours de marginalisation est destiné à l'apoptose.

Il faut distinguer les deux principaux types de leucocytes impliqués dans ce processus. Le polynucléaire neutrophile libère lors de son activation un grand nombre de médiateurs préformés, des protéines granulaires, et des produits formés de novo comme le LTB4, le PAF-acéther, les radicaux libres... Le monocyte-macrophage a des propriétés sécrétoires plus étendues. Il a tout d'abord lui aussi la possibilité de libérer ces médiateurs précoces : protéines granulaires, dérivés de l'acide arachidonique (PGE2, TXA2, LTC4, LTD4, pafacéther). Il est un producteur de monoxyde d'azote après activation de la NO-synthétase inductible. Ce NO peut interagir avec les radicaux libres pour former des substances cytotoxiques, les peroxynitrites. Mais le monocyte se différencie du polynucléaire par la possibilité de synthétiser *de novo* des protéines : interleukine 1, TNF. Ces cytokines, par effet autocrine et paracrine, vont à leur tour faire synthétiser et libérer des médiateurs secondaires ou tardifs, cytokines et facteurs de croissance (interleukines 1, 6, 8 et 10, TNF, TCFB, GM-CSF). Ces facteurs propagent et amplifient la réaction inflammatoire.

Retenons pour notre propos que les leucocytes activés ont acquis des propriétés rhéologiques particulières qui sont à même de modifier notablement les conditions microcirculatoires avoisinantes. Ils sont susceptibles d'obturer la lumière des microvaisseaux, d'autant plus qu'ils ont acquis la propriété de s'y ancrer. Leurs sécrétions multiples vont favoriser les différentes étapes de la coagulation, favoriser les interactions plaquettes-paroi, rendre les hématies plus rigides et plus agrégables, accroître la fibrinogénémie. Cette activation leucocytaire a donc des propriétés thrombogènes et détermine une hyperviscosité sanguine qui participe aux modifications circulatoires caractéristiques de l'inflammation (4).

Les changements initiaux qui précèdent la mise en place des lésions athéroscléreuses se produisent donc au niveau de l'endothélium. Au niveau de sites particuliers des artères (branches, bifurcations, courbures) caractérisés par un cisaillement plus bas et des turbulences, vont s'exprimer des molécules d'adhésion pour les monocytes et les cellules T, lesquels vont localement migrer et s'accumuler. L'endothélium devient plus perméable aux lipoprotéines et autres constituants plasmatiques sous l'influence du NO, de la PGI2, du PDGF, de l'ATII et de l'endothéline. Les molécules d'adhésion leucocytaire sont up-régulées (L-sélectines, intégrines, platelet endothelial cell adhesion molecule 1). Parallèlement la surface de la cellule endothéliale surexprime des molécules d'adhésion endothéliales : E sélectine, P sélectine, ICAM-1, vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). La migration des leucocytes dans la paroi artérielle est favorisée par différents facteurs dont les LDL oxydées, la monocyte chemotactic protein 1, l'IL8, le PDGF, le MCSF et l'ostéopontine.

L'étape suivante est la mise en place de la strie lipidique qui est au départ un amoncellement intrapariétal de cellules mononucléées gorgées de lipides (cellules spumeuses ou foam cells) auxquelles se joindra un contingent de cellules musculaires lisses. Les facteurs d'adhérence des leucocytes interviennent aussi à ce stade pour favoriser ce processus.

L'évolution de la plaque est une cicatrisation fibreuse, en réponse à l'agression. Ce mécanisme met en fait en jeu un afflux nouveau de leucocytes. La thrombogénicité de cette plaque qui fait en définitive sa gravité est déterminée

Travail présenté à la Session d'Hémorhéologie clinique, XXXIVe congrès du Collège Français de Pathologie Vasculaire, Paris, le 15 mars 2000.

Reçu le 3 juillet 2000.
Acceptation par le comité de Rédaction le 31 juillet 2000.

Tirés à part : J.-F. BRUN, adresse ci-dessus.
E-mail : drjfbrun@aol.com

par son instabilité qui la rend apte à se fissurer. Ce mécanisme est associé à un afflux persistant de leucocytes. Le leucocyte, et tout particulièrement le monocyte (précurseur du macrophage) se trouve donc présent à toutes les étapes de l'athérogenèse et impliqué dans les effets thrombogènes de celle-ci (2).

ÉPIDÉMIOLOGIE : DES FACTEURS DE RISQUE « CLASSIQUES » À L'HÉMORHÉOLOGIE, ET DE L'HÉMORHÉOLOGIE AU LEUCOCYTE...

A l'orée des années 90, des études prospectives de haute tenue ont permis de donner aux facteurs de la viscosité sanguine (dont le fibrinogène) et à l'activation leucocytaire, qui leur est étroitement liée, le statut de facteurs de risque. A côté de plusieurs études portant sur les pathologies coronariennes (6-9), nous considérerons plus particulièrement l'*Edinburgh Artery Study* (10) qui a apporté des arguments particulièrement probants permettant d'impliquer les paramètres hémorhéologiques dans la pathogénie des artériopathies oblitérantes. Cette étude avait en effet pour objet de préciser sur une population générale, c'est-à-dire un échantillon non biaisé sur le plan du recrutement, l'importance réelle de ces facteurs rhéologiques tant que déterminants de l'artériopathie oblitérante. L'étude était conçue de manière à situer ces paramètres par rapport aux autres facteurs de risque « classiques » (tabac, HTA, cholestérol,...).

Elle a été conçue comme une étude épidémiologique transversale et a été menée sur la population générale d'Edimbourg (Ecosse) représentée par un échantillon de 1 592 hommes et femmes âgés de 55 à 74 ans, issus des différentes zones géographiques et des différentes couches sociales de cette ville à forte prévalence d'artériopathies.

Deux indicateurs d'artériopathies y étaient analysés :

— le degré de sténose périphérique (apprécié par l'*ankle-brachial systolic pressure index* ABPI)

— le degré d'ischémie des membres inférieurs, apprécié par l'évaluation du degré de claudication intermittente et le test d'hyperhémie réactive.

Une hypothèse de départ que l'étude d'Edimbourg devait évaluer était que l'importance de l'ischémie, pour un degré déterminé de sténose athérosclérotique, dépendrait de deux paramètres hémorhéologiques : la *viscosité sanguine* et l'*activation leucocytaire*.

LES DÉTERMINANTS STATISTIQUES DU DEGRÉ DE STÉNOSE PÉRIPHÉRIQUE

L'analyse des résultats de ce travail met tout d'abord en évidence trois déterminants statistiques du degré de sténose périphérique (mesuré par l'ankle-brachial systolic pressure index ABPI). Ce sont : *la viscosité sanguine, la viscosité plasmatique et le fibrinogène*. La relation statistique avec le fibrinogène est, en fait, dépendante de l'importance du tabagisme. Cependant, une particularité de cette étude est que la prise en compte des facteurs de risque « classiques » (âge, sexe masculin, tabagisme, cholestérol HDL, cholestérol non-HDL, pression artérielle systolique) n'élimine pas ces facteurs rhéologiques, lorsque l'on procède à une analyse multivariée... Il faut cependant observer que ces facteurs « classiques », de leur côté, ne sont pas davantage « éliminés » par les facteurs rhéologiques. Les relations entre le degré de sténose (mesuré par l'ABPI) et la rhéologie s'observent uniquement dans le sexe masculin et ne sont pas significatives chez les femmes. En analyse multivariée, si l'on cherche à hiérarchiser les déterminants de ce degré de sténose, on retient une « influence » indépendante (statistiquement parlant) de *la viscosité sanguine et du fibrinogène*, ce qui est en accord avec l'hypothèse qui fait de ces deux facteurs des agents impliqués dans l'athérogenèse au niveau des troncs artériels périphériques.

LES DÉTERMINANTS DU DEGRÉ D'ISCHÉMIE DES MEMBRES INFÉRIEURS

En ce qui concerne les déterminants du degré d'ischémie des membres inférieurs (évalué par la claudication et le test d'hyperhémie réactive) l'analyse statistique *univariée* retient *la viscosité sanguine (odds ratio 2,06) et le fibrinogène (odds ratio 1,6)*. A vrai dire, lorsque l'on réalise une analyse statistique *multivariée* on ne retrouve plus ces facteurs rhéologiques dans les déterminants de l'ischémie : curieusement, seuls le tabagisme et l'âge restent des déterminants significatifs. Cependant, pour Lowe, il pourrait s'agir d'une erreur de type 2 liée au faible nombre de claudicants. En effet, l'étude met par ailleurs en évidence une intéressante relation entre la viscosité et le risque de claudication : si l'on distribue la population de l'étude en quintiles de viscosité plasmatique, il apparaît que le risque relatif de présenter une claudication est de 8,51 dans le quintile supérieur (viscosité > 1,41 mPa.s) contre 1,32 dans le quintile inférieur (viscosité < 1,26 mPa.s) : soit un risque multiplié par 3,35. Cette observation va donc dans le sens d'une implication de la viscosité du sang dans le mécanisme de la claudication ; d'autant que l'allure de cette relation rappelle fortement une relation analogue, retrouvée entre viscosité du plasma et coronaropathie, observée dans l'étude de Caerphilly et Speedwell (8). Au total, il est logique de considérer, comme le fait Lowe dans la conclusion de son travail, qu'une augmentation de la viscosité plasmatique a pour effet de réduire l'irrigation du territoire post-sténotique, tant dans les coronaires que dans les troncs périphériques. Cet effet hémodynamique semblerait donc être impliqué dans le mécanisme de l'ischémie post-sténotique.

Mais il faut mentionner un autre déterminant potentiel de l'ischémie qui nous intéresse plus particulièrement ici : *l'activation leucocytaire*. Cette dernière a été explorée, dans l'étude d'Edimbourg, à l'aide de la mesure des concentrations sériques d'élastase. Il s'avère que *l'élastase est à l'analyse multivariée un prédicteur indépendant d'ischémie en aval de la lésion athéromateuse*. Ceci porte à penser que l'activation leucocytaire, parallèlement à la viscosité plasmatique, interviendrait en cas de sténose

artérielle pour compromettre l'irrigation du territoire situé en aval, favorisant l'ischémie.

Ainsi, l'étude d'Edimbourg suggère que le degré de sténose athéromateuse des artères périphériques est influencé par la viscosité sanguine et le fibrinogène, deux facteurs qui trouvent leur place logique dans l'histoire naturelle de l'athérogenèse telle que nous la concevons aujourd'hui. En effet, la viscosité, augmentant au niveau des bifurcations et des coudures, induit des forces de cisaillement pariétal localisées, qui provoquent l'adhésion des plaquettes et des leucocytes à l'endothélium, promouvant l'infiltration des lipoprotéines et du fibrinogène dans la paroi, et favorisant l'initiation des plaques. Parallèlement, le niveau de fibrinogénémie détermine l'infiltration intrapariétale de fibrinogène, favorise l'agrégation plaquettaire, et fournit le substrat de la fibrinoformation. *Une fois la lésion athéromateuse constituée, la viscosité plasmatique et l'activation leucocytaire favoriseraient l'ischémie.*

Il existe d'autres études montrant des relations entre maladie athérothombotique et activation des leucocytes. La méthodologie d'appréciation de cette dernière est différente. Ciuffetti (11) étudie la filtrabilité (et la numération) des sous-populations leucocytaires chez 20 artéritiques de stade II. La numération leucocytaire était augmentée au début des douleurs de claudication, et les monocytes devenaient moins filtrables. Galante (12) montre que les leucocytes (neutrophiles, lymphocytes et monocytes) des patients athéromateux des membres inférieurs ou des coronaires ont une expression accrue de l'intégrine LFA-1 et s'agrègent 2,6 fois plus. Il en conclut que des modifications hémorhéologiques des leucocytes sont présentes chez les patients athéroscléreux et pourraient contribuer à l'ischémie chronique. Cependant dans cette série les numérations leucocytaires ne montraient pas de différence.

L'activation leucocytaire observée lors de l'athérome est également en corrélation avec les facteurs de risque. Elneihoum et coll (13) ont ainsi mesuré chez 156 patients porteurs d'athérome carotidien asymptomatique, les taux circulants de neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) et de neutrophil protease 4 (NP4) considérés comme des marqueurs d'activation des neutrophiles et de tumor necrosis factor alpha (TNF) et de soluble TNF receptor-1 (sTNFR-1) considérés comme des marqueurs d'activation des monocytes/macrophages. Les taux circulants de TNF et de sTNFR-1 s'avéraient corrélés à la pression artérielle systolique et ceux de NGAL à la diastolique. Ces deux marqueurs (sTNFR-1 et de NGAL) et le TNF étaient deux fois plus élevés chez les fumeurs qui avaient en outre des taux de NP4 plus élevés. Le NGAL chez les femmes était plus élevé en cas d'hypertension. Ainsi, chez des sujets porteurs d'athérome asymptomatique, les marqueurs d'activation leucocytaire sont plus élevés chez les fumeurs et les hypertendus, et leur élévation est proportionnelle à l'âge et à la pression artérielle.

On voit cependant que l'activation du leucocyte n'est pas toujours appréciée de façon extrêmement précise et spécifique dans de telles études, surtout lorsqu'elles portent sur de larges effectifs de patients. Récemment un autre marqueur potentiel a été évalué : l'interleukine 6 (14). Dans une étude portant sur 753 hommes et 821 femmes âgés de 25 à 74 ans, les paramètres hémorhéologiques montraient après ajustement pour leurs différents déterminants une corrélation avec la prévalence de maladies athéromateuses, et l'analyse multivariée retenait comme déterminants « indépendants » la viscosité plasmatique et l'agrégation des hématies. L'interleukine 6 mesurée dans un sous-échantillon représentant 25 % des sujets de cette étude s'avérait être corrélée à l'âge, au fibrinogène, au nombre de leucocytes, à la viscosité plasmatique et sanguine, au tabagisme (chez les hommes) et à des taux sériques bas de vitamine C. Cependant, les concentrations d'interleukine 6 n'étaient pas corrélées à la prévalence de lésions athéromateuses, et, de même, n'étaient pas corrélées aux facteurs de risque « classiques ».

On doit donc reconnaître que l'implication des facteurs leucocytaires dans l'athérothrombose est surtout suggérée par des arguments indirects tirés de travaux biologiques expérimentaux et que les marqueurs « simples » utilisés en épidémiologie (numération leucocytaire, élastase, IL-6) posent des problèmes de spécificité et/ou de sensibilité. Néanmoins, si l'on considère conjointement toutes ces données, expérimentales et épidémiologiques, l'importance de l'activation leucocytaire dans la pathogénie des processus athérothrombotiques apparaît avec évidence.

LE LEUCOCYTE : UN AGENT HÉMORHÉOLOGIQUE MAJEUR

Comme on l'a vu à propos des études épidémiologiques, l'activation leucocytaire est généralement étroitement associée à des perturbations hémorhéologiques plus classiques, portant sur la viscosité plasmatique, le fibrinogène, et l'agrégation des hématies. Ces mécanismes apparaissent à l'analyse multivariée comme des déterminants des lésions athéromateuses et de leurs conséquences ischémiques et thrombotiques, statistiquement indépendants des « facteurs de risque classiques ».

Il est probable que l'activation leucocytaire joue un rôle important dans ces perturbations hémorhéologiques. En effet celle-ci s'accompagne de la production par le leucocyte de molécules susceptibles d'affecter le globule rouge. Les leucocytes activés affectent les cellules qu'ils cotoient, et les érythrocytes sont plus spécialement exposés. La production de radicaux libres rend plus agrégable et plus rigide le globule rouge. On peut citer les enzymes protéolytiques qui accroitraient l'agrégabilité érythrocytaire (4), et les cytokines monocytaires activatrices de la formation de fibrinogène par l'hépatocyte : IL6, Leukemia inhibitory factor ou LIF, et surtout l'Oncostatine M (ou OSM) qui sextuple la production de fibrinogène par l'hépatocyte.

L'effet direct de l'activation des leucocytes polynucléaires sur les propriétés rhéologiques des hématies a été élégamment montré *in vitro* par Baskürt (15). Cet auteur a étudié des érythrocytes isolés incubés avec des polynucléaires provenant du même échantillon sanguin. Ces polynucléaires étaient activés *in vitro* par deux procédés : addition de 1 ng/mL de tumor necrosis factor alpha

(TNF-α) et addition de 10^{-7} M de N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP), ainsi que l'association fMLP - TNF-α. Après incubation pendant 2 h à 37 °C, on voit que cette activation accroît l'agrégabilité et diminue la déformabilité des hématies. Le blocage de l'action protéasique par le phénylméthylsulfonyl fluorure et le blocage du stress oxydatif par la superoxide dismutase associée à la catalase empêche ces effets. Le TNF-α et le fMLP seuls n'ont aucun effet décelable sur les propriétés des hématies si les polynucléaires ne sont pas présents.

Ainsi l'activation des polynucléaires a pour effet de rendre les érythrocytes tout à la fois plus agrégables (moins désagrégables) et plus rigides, principalement par deux mécanismes : la production de protéases et le stress oxydatif entraîné par les radicaux libres.

Ces mécanismes participent probablement dans des conditions physiologiques à l'hyperviscosité transitoire adaptative de situations telles que l'exercice physique (16, 17). Ainsi le stress oxydatif entraîné par l'exercice rend les hématies plus rigides et plus agrégables, d'autant plus qu'il contribue à accroître la fibrinogénémie. Ces mécanismes pourraient participer aux accidents cardiovasculaires (infarctus, mort subite) survenant au cours d'exercices intenses (17). On peut par contre signaler que certaines situations comme la déshydratation entraînent au contraire une réactivité émoussée des leucocytes, dont la signification physiologique n'est pas bien claire (18). Dans des conditions pathologiques, la production par le leucocyte de substances entraînant une hyperviscosité est amplifiée par l'hypoxie (19).

LE RÔLE AMBIGU DU MONOXYDE D'AZOTE

Il est hasardeux de simplifier à l'extrême ces interactions complexes qui demeurent imparfaitement connues. C'est ce qu'illustre bien la question assez embrouillée du NO, qui a selon les conditions expérimentales des effets antiathérogènes ou proathérogènes (20). Cet autacoïde sécrété par l'endothélium est à l'évidence un protecteur vasculaire. En synergie avec la prostacycline (PGI2), le NO inhibe l'agrégation des plaquettes et leur adhésion, ainsi que l'adhésion et la migration des leucocytes. Dans certains territoires artériels ces deux substances agissent également de manière synergique pour favoriser la vasodilatation. Le développement de l'athérosclerose (et l'hyperlipidémie prise isolément) réduisent cette capacité de vasodilatation endothélium-dépendante. L'athérosclérose s'accompagne de modifications d'activité des isoformes de la NO synthétase (NOS) dans la paroi artérielle, avec notamment une expression plus importante de l'isoforme NOS2 (inductible) tandis qu'un fonctionnement défectueux de la NOS3 endothéliale s'instaure, déterminant des conditions favorables à l'adhésion des leucocytes, à leur adhésion, au vasospasme, et à la thrombose. Ces mécanismes pourraient en outre favoriser la prolifération des cellules intimales. Dans l'HTA un état inflammatoire est induit par la production de peroxyde d'hydrogène et de radicaux libres tels l'anion superoxyde et les radicaux hydroxyles dans le plasma. Cela réduit la formation de NO dans l'endothélium, accroît l'adhésion des leucocytes et augmente les résistances périphériques vasculaires (2). L'homocystéine, facteur athérogène bien connu, agirait non seulement par ses effets toxiques directs sur l'endothélium, par ses effets prothrombotiques, et par l'augmentation de synthèse de collagène qu'elle détermine, mais aussi en réduisant la production endothéliale de NO (2).

Cependant, à côté de ces effets protecteurs bien établis du NO qui deviennent déficients dans la maladie athéromateuse, il est troublant de noter que la production de NO et d'anion superoxyde par les cellules inflammatoires impliquées dans l'athérogenèse aboutit, tout au contraire, à la formation de dérivés fortement cytodestructeurs : les radicaux peroxynitrites, qui sont à même de provoquer des lésions de l'endothélium et des myocytes de la paroi vasculaire, provoquant l'apoptose des cellules et favorisant la rupture de plaque qui déclenchera l'accident thrombotique....

Si nous considérons le rôle purement hémorhéologique du NO, il faut tout d'abord rappeler les travaux de Korbut (21, 22) qui montraient que l'inhibition de production de NO prévient la rigidification des hématies induite par l'activation leucocytaire dans un modèle expérimental d'inflammation. L'équipe de Baskürt (23) a tenté de clarifier cette question en étudiant l'effet du nitroprussiate de sodium (SNP) (un donneur de NO) sur la déformabilité des hématies et leur agrégabilité. L'expérience réalisée par Baskürt consistait à définir les effets d'une HTA induite par un inhibiteur de la NO-synthétase, le NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) sur les globules rouges de rats. Chez ces rats le L-NAME était ajouté à l'eau de boisson pour entraîner une hypertension. L'inhibition de synthèse de NO par le L-NAME accroît effectivement de 60 % la pression artérielle, ralentit le temps de transit des hématies et augmente l'agrégation de celles-ci. Sur des échantillons de sang le Sodium SNP (donneur de NO), était ajouté à concentrations croissantes (de 10 à 1 000 μM). L'incubation en présence de SNP à 20 °C durant 1h de ces érythrocytes réduit de façon dose-dépendante l'agrégation des hématies. Celle-ci reste cependant plus élevée dans le groupe hypertensif que dans le groupe témoin à toutes les concentrations de SNP. Le SNP n'affecte pas la déformabilité érythrocytaire dans le groupe hypertendu, mais l'améliore discrètement à 10 μM de concentration dans le groupe contrôle. Ces données *in vitro* suggèrent que le NO affecte directement le globule rouge, améliorant sa rhéologie. La différence fondamentale entre le travail de Korbut (21, 22) qui suggérait un effet défavorable et celui de Baskürt (23) qui montre une action favorable est sans doute le site de production de NO affecté par l'expérience : NO leucocytaire ou NO endothélial.

Il faut en outre souligner comme le suggère Baskürt que l'augmentation de l'agrégation des hématies pourrait réduire le cisaillement pariétal qui est le stimulus principal de la production endothéliale de NO, ce qui ferait ainsi de l'agrégation érythrocytaire un mécanisme contribuant à la baisse de production de NO par l'endothélium.

INTERACTIONS ENTRE LEUCOCYTES ET PLAQUETTES LORS DE L'ATHÉROGENÈSE : UN FEEDBACK NÉGATIF ?

Il est clair que leucocytes et plaquettes sont tous deux pourvus de propriétés athérothrombogènes majeures. Cependant ces mécanismes pourraient ne pas être synergiques, mais équilibrés par un mécanisme homéostatique comme le suggère un récent travail. Chez 197 sujets porteurs d'athéromatose asymptomatique et âgés de 49 à 69 ans, Anwaar (24) a mesuré le 3', 5'-guanosine monophosphate cyclique [cGMP] et le 3', 5'-adénosine monophosphate cyclique [cAMP]), l'endothéline plasmatique (ET-1), la neoptérine plasmatique, la neutrophil protease 4 (NP4), le tumor necrosis factor mu (TNFμ), le soluble tumor necrosis factor receptor-1 (sTNFR-1), et la neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL). Ces auteurs montrent une relation entre les médiateurs inflammatoires produits par les leucocytes et les nucléotides cycliques intraplaquettaires. Ainsi le cGMP est-il inversement corrélé à l'ET-1 circulante, l'ET-1 étant un inhibiteur de la production de NO tandis que le NO exercerait un effet inhibiteur (médié par le cGMP) sur la production d'ET-1. Néoptérine et NP4 étaient quant à eux corrélés au cGMP intraplaquettaire et le cAMP intraplaquettaire était corrélé au TNFμ circulant et au sTNFR-1. Toutes ces corrélations indiquent que les leucocytes exerceraient un effet modérateur sur l'agrégabilité plaquettaire, que ces auteurs interprètent comme un mécanisme de feedback négatif qui inhiberait l'activation plaquettaire au cours de la réaction inflammatoire qui caractérise l'évolution de l'athérogénèse.

CONCLUSION

Dans l'état actuel des connaissances, il faut souligner la complexité des interactions entre leucocytes, endothélium, hémorhéologie, plaquettes et athérothrombose et le caractère encore fragmentaire de notre compréhension de ces mécanismes.

Il est néanmoins raisonnablement possible de conclure par quelques remarques : tout d'abord, les perturbations hémorhéologiques et l'activation érythrocytaire semblent aller de paire et sont très probablement deux mécanismes étroitement intriqués, contribuant conjointement à l'athérogenèse dans laquelle elles jouent vraisemblablement un rôle aussi fondamental, bien que moins bien démontré, que les lipoprotéines. Il est par exemple très intéressant d'observer que l'amélioration du périmètre de marche lors de claudications intermittentes s'accompagne d'une réduction conjointe des facteurs « classiques » de la viscosité et de l'activation leucocytaire (25). De la sorte, certains marqueurs hémorhéologiques simples comme la viscosité plasmatique, dont l'intérêt est démontré par les quelques trop rares études épidémiologiques où elle a été mesurée, nous paraissent mériter d'être plus largement étudiés dans les maladies vasculaires. Tout récemment nous avons observé que ce paramètre est un marqueur d'insulino-résistance (26) sensible aux stratégies hygiéno-diététiques (27) visant à corriger cette situation de risque cardio-vasculaire majeur.

L'activation leucocytaire, dont l'importance est montrée par des arguments indirects (expérimentaux ou épidémiologiques), est d'étude difficile, et plus malaisée encore à apprécier chez un patient dans un contexte de pratique médicale. Cependant, à côté des marqueurs sophistiqués et peu abordables qui fleurissent dans la littérature à ce propos, nous avons vu que l'épidémiologie remet en honneur une mesure banale et toute simple de médecine quotidienne : la numération des leucocytes au cours d'un hémogramme de routine.

L'activation érythrocytaire et l'hyperviscosité sont donc deux phénomènes étroitement interdépendants dans le cadre de la maladie athéromateuse, bien que l'analyse statistique les dissocie souvent et en fasse des facteurs de risque « indépendants ». Malgré la grande complexité de ces interactions, des marqueurs biologiques relativement simples et abordables de ce processus semblent peu à peu se dégager et permettront probablement de faire passer ces concepts du domaine de la recherche pure à celui de la médecine pratique.

RÉFÉRENCES

1. GOULD AL, ROSSOUW JE, SANTANELLO NC, HEYSE JF, FURBERG CD. Cholesterol reduction yields clinical benefit : impact of statin trials. *Circulation,* 1998 ; *97 :* 946-52.
2. ROSS R. Atherosclerosis — an inflammatory disease. *N Engl J Med,* 1999 ; *340 :* 115-26.
3. BLUM A, MILLER HI. The role of inflammation in atherosclerosis. *Isr J Med Sci,* 1996 ; *32 :* 1059-65.
4. RAMPLING MW. Haemorheology and the inflammatory process. *Clin Hemorheol Microcirc,* 1998 ; *19 :* 129-32.
5. BOISSEAU MR. Microcirculation and microrheology. *In* PM Van-Houtte, Ph Douste-Blazy (eds) Fish oil and blood-vessel wall interactions. John Libbey Eurotext, Paris, 1991, 17-36.
6. LOWE GDO, SMITH WCS, TUNSTALL-PEDOE H, CROMBIE IK, LENNIE SE, ANDERSON J, BARBENEL JC. Cardiovascular risk and hemorheology. results from the Scottish Heart Study and the MONICA Project, Glasgow. *Clin Hemorheol,* 1988 ; *8 :* 517-24.
7. LOWE GDO, WOOD DA, DOUGLAS JT, RIEMERSMA RA, MCINTYRE CCA, TAKASE I, TUDDENHAM EGD, FORBES CD, ELTON RA, OLIVER MF. Relationships of plasma viscosity, coagulation and fibrinolysis to coronary risk factors and angina. *Thromb Haemost,* 1991 ; *65 :* 339-43.
8. YARNELL JWG, BAKER IA, SWEETNAM PM, BAINTON D, O'BRIEN JR, WHITEHEAD PJ, ELWOOD PC. Fibrinogen, viscosity and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell Heart Disease studies. *Circulation,* 1991 ; *83 :* 836-44.
9. KOENIG W, ERNST E. The possible role of hemorheology in atherothrombogenesis. *Atherosclerosis,* 1992 ; *94 :* 93-107.
10. LOWE GDO, FOWKES FGR, DAWES J, DONNAN PT, LENNIE SE, HOUSLEY E. Blood viscosity, fibrinogen, and activation of coagulation and leukocytes in peripheral arterial disease and the normal population in the Edinburgh Artery Study. *Circulation,* 1993 ; *87 :* 1915-20.
11. CIUFFETTI G, MERCURI M, LUPATTELLI G, LOMBARDINI R, OTT C, MANNARINO E. Blood rheology during induced ischaemia of the lower limbs. *Wien Klin Wochenschr,* 1990 ; *102 :* 77-80.
12. GALANTE A, PIETROIUSTI A, MAGRINI A, CARTA S, FRANCESCHELLI L, PICCOLO P, PISTOLESE GR, MARTELLI E, MASTINO A, MATTEUCCI C, GRELLI S, FAVALLI C. Leucocyte rheological properties are altered in patients with diffuse atherosclerosis. *Thromb Haemost,* 1997 ; *77 :* 1073-6.
13. ELNEIHOUM AM, FALKE P, HEDBLAD B, LINDGÄRDE F, OHLSSON K. Leukocyte activation in atherosclerosis : correlation with risk factors. *Atherosclerosis,* 1997 ; *131 :* 79-84.
14. WOODWARD M, RUMLEY A, TUNSTALL PEDOE H, LOWE GDO.

Associations of blood rheology and interleukin-6 with cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. *Br J Haematol,* 1999 ; *104 :* 246-57.

15. BASKÜRT OK, MEISELMAN HJ. Activated polymorphonuclear leukocytes affect red blood cell aggregability. *J Leukoc Biol,* 1998 ; *63 :* 89-93.
16. TEMIZ A, BASKÜRT OK. Can White Blood Cell Activation be One of the Major Factors that Affect Hemorheological Parameters During and After Exercise ? 11th European Conference on Clinical Hemorheology, Rouen (France September 20-22) Abstracts. *J Mal Vasc* (Suppl B), 2000, *25 :* 146.
17. AJMANI RS, FLEG JL, RIFKIND JM. Role of oxidative stress on hemorheological and biochemical changes induced during treadmill exercise. 11th European Conference on Clinical Hemorheology, Rouen (France September 20-22) Abstracts. *J Mal Vasc* (Suppl B), 2000, *25 :* 144.
18. FYODOROVA M, LEVIN V. Physiological reactions of blood leukocytes in dehydration in rats. 11th European Conference on Clinical Hemorheology, Rouen (France September 20-22) Abstracts. *J Mal Vasc* (Suppl B), 2000, *25 :* 168.
19. CAPECCHI PL, PASINI FL, CATI G, COLAFATI M, ACCIAVATTI A, CECCATELLI L, PETRI S, DE LALLA A, DI PERRI T. Experimental model of short-time exercise-induced preconditioning in POAD patients. *Angiology,* 1997 ; *48 :* 469-80.
20. DUSTING GJ, FENNESSY P, YIN ZL, GUREVICH V. Nitric oxide in atherosclerosis : vascular protector or villain ? *Clin Exp Pharmacol Physiol,* (Suppl) 1998 ; *25 :* S34-41.
21. KORBUT R, GRYGLEWSKI RJ. Nitric oxide from polymorphonuclear leukocytes modulates red blood cell deformability in vitro. *Eur J Parmacol,* 1993 ; *234 :* 17.
22. KORBUT R, GRYGLEWSKI RJ. The effect of prostacyclin and nitric oxide on deformability of red blood cells in septic shock in rats. *J Physiol Pharmacol,* 1996 ; *47 :* 591-9.
23. BOR KUÇUKATAY M, YALÇIN O, KAYER E, KAPUTLU I, BASKÜRT OK. Red blood cell rheology in L-NAME-induced hypertension. *Biorheology,* 1999 ; *36 :* 95 (abstract).
24. ANWAAR I, GOTTSÄTER A, HEDBLAD B, PALMQVIST B, MATTIASSON I, LINDGÄRDE F. Endothelial derived vasoactive factors and leukocyte derived inflammatory mediators in subjects with asymptomatic atherosclerosis. *Angiology,* 1998 ; *49 :* 957-66.
25. LAGHI-PASINI F, CAPECCHI PL, ACCIAVATTI A, PETRI S, DE LALLA A, CATI G, COLAFATI M, DI PERRI T. Pharmacological preconditionning of ischemia. *Clin Hemorheol,* 1997 ; *17 :* 73-84.
26. BRUN JF, PIERRISNARD E, PÉREZ-MARTIN A, MONNIER JF, GRANAT Ch, SAGNES C, MERCIER J. Relationships between insulin resistance measured with the minimal model and blood rheology : a multivariate analysis. 11th European Conference on Clinical Hemorheology, Rouen (France September 20-22) Abstracts. *J Mal Vasc* (Suppl B), 2000, *25 :* 164.
27. PÉREZ-MARTIN A, BRUN JF, FÉDOU C, GRANAT CH, SAGNES C, ALEMANY MJ, MERCIER J. Regular exercise (3x45 min/wk) decreases plasma viscosity in sedentary obese, insulin resistant patients parallel to an improvement in fitness and a shift in substrate oxidation balance. 11th European Conference on Clinical Hemorheology, Rouen (France September 20-22) Abstracts. *J Mal Vasc* (Suppl B), 2000, *25 :* 170.