

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année : 2019

N° 2019-190

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

DES de Chirurgie Générale

par

Aurore DANVIN
née le 15/08/1989 à Guingamp (22)

Présentée et soutenue publiquement le 15 octobre 2019

Corrélation entre l'ossification de l'artère fémorale commune et la sévérité des complications vasculaires systémiques et des membres inférieurs chez les patients opérés.

Président : Monsieur le Professeur Yann GOUËFFIC

Directeur de thèse : Madame le Docteur Blandine MAUREL

TABLE DES MATIERES

ABRÉVIATIONS.....	3
REMERCIEMENTS	4
INTRODUCTION	6
L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire.....	6
Rôle des monocytes et des macrophages	6
Rôle des lymphocytes B.....	7
Les calcifications vasculaires.....	8
Les biocollections ECLA et ECLAGEN.....	10
A l'échelle histologique	10
A l'échelle moléculaire	11
A l'échelle transcriptomique	11
Relation translationnelle	11
Problématique et but de notre étude	12
MATERIEL ET METHODE.....	13
Ethique	13
Population.....	13
Recueil et conditionnement des échantillons humains.....	14
Critères de jugement primaire et secondaires	15
Analyses statistiques.....	15
RESULTATS.....	17
Population.....	17
Démographie.....	17
Résultats cliniques.....	17
Comparaison à la littérature	18
Survenue de MACE et MALE	23
Impact du type de calcification sur la survenue d'un MACE ou d'un MALE.....	25
Impact de l'inflammation biologique et histologique	26
DISCUSSION	30
CONCLUSION	35
BIBLIOGRAPHIE.....	36
ANNEXE	44

ABRÉVIATIONS

AHA : American Heart Association

AIT: accident ischémique transitoire

AOMI: artériopathie oblitérante des membres inférieurs

AVC: accident vasculaire cérébral

CHU : centre hospitalo-universitaire

CML: cellules musculaires lisses vasculaires

CNIL: commission nationale de l'informatique et des libertés de France

CRP : c-reactive protein

ECLA: étude comparative des lésions athéromateuses

ECLAGEN: étude comparative des lésions athéromateuses et génétique

ECLA-LT : étude comparative des lésions athéromateuses au long terme

IL : interleukine

IPS: indice de pression systolique

LDL : low density lipoprotein

MACE: major adverse cardiac event

MALE: major adverse limb event

MMPs : métalloprotéinases

NFS: numération et formule sanguine

OPG: ostéoprotégérine

Ox-LDL : LDL oxydée

PABIF : pontage aorto-bi-fémoral

RANK: Receptor Activator of Necrosis Factor-Kappa Beta

RANKL: RANK Ligand

TER: target-extremity revascularization, revascularisation du membre index

TGF- β : transforming growth factor beta

TLR : target lesion revascularization, revascularisation de la lésion index

REMERCIEMENTS

A mon Papa,

Tout d'abord tu m'as donné le goût de la chirurgie ; puis tu m'as poussé à soutenir ma thèse, heureusement.

A ma Fille et à mon Mari,

Sans qui rien de tout cela ne vaudrait la peine.

Tout d'abord, je tiens à remercier chacun des membres de mon jury. Parce que chacun d'entre vous a personnellement apporté un petit quelque chose à mon édifice, mon identité professionnelle mais aussi personnelle :

- Yann, tes connaissances scientifiques et ta maîtrise du geste technique (endovasculaire surtout) m'ont souvent déconcertées et je les ai enviées ; je garde aussi en mémoire la facilité et la générosité avec lesquelles tu m'as ouvert les portes de la recherche fondamentale.
- Blandine, c'est avec toi que j'ai évoqué la première fois mes questions et mes doutes sur la maternité d'une femme-chirurgien.
- M. Picquet, vous m'avez tant appris chirurgicalement ; mais vous endossez surtout l'image du « Père de famille de la chirurgie », en plus du rôle de patron. Et quelle image !
- Olivier, je garde tout particulièrement un souvenir attendri de nos discussions au-dessus de la paillasse, au laboratoire.
- Thibaut, il est peu d'hommes dont j'ai autant pu apprécier la douceur, l'humour et le flegme. Un modèle de persévérance et une crème de tuteur.

Ensuite viennent tous les membres de ma famille, vous qui m'avez soutenu de manière infaillible pendant toutes ces années : Papa, Maman, Nicole et Christian ; Aline et Kévin, Cécile et Flo, Chloé, Noémie ; et tous les autres...

Professionnellement, on n'est pas grand-chose sans ceux qui nous entourent. Je pense tout particulièrement à PAV, c'est avec un plaisir réel et non dissimulé que j'ai pu travailler avec toi, pendant 2 semestres. « Cisa-oooh ! » Et tous les autres bien sûr : Philippe, Alain, Adrien, Nicolas, Flora, Marie, Charlotte ; toute l'équipe paramédicale du service et du bloc opératoire de Chir Vascu de Laennec ; les équipes des services de Chirurgie Vasculaire du CHU d'Angers et du CHD de La Roche sur Yon. Mentions spéciales pour Yves Rébufat, qui m'a épaulé lors de ma reprise en janvier, pour Greg (« à Montpeuuul... »), pour Philippe P. (« t'es faite pour la chirurgie veineuse, ma p'tite ! »)

Entre les séniors et les copains, il y les co-internes qui nous marquent, qui m'ont marqué. A chaque fois, on se serre les coudes dans la misère, puis les amitiés restent ! Je remercie

vivement Annabelle, déjà Chirurgienne Viscérale, et Anna, future Chirurgienne Vasculaire. A très vite !

Et enfin les copains, ceux qui suivent de près ou de loin ces fous qui font des études de médecine. Les copines du lycée, vous êtes tellement chères à mon cœur ! Lélé, Momo, Nono, DD, Niniss, M-C, Jane, Chacha, et tous les conjoints. Les copains de St Phil, vous qui m'avez accepté si facilement auprès de Yoann : Bibou, Alex, Freddy, YoM, Clarelle et Eddie, Nadège et Val, Cindy, Emily, Aurélie.

Et pour tout le soutien que vous m'avez apporté dans mes moments de doute depuis 2 ans, un grand merci à Anne, Marie, Morgane et Pascal.

INTRODUCTION

Les pathologies athéromateuses sont la première cause de mortalité dans le monde (1) ; et sont également pourvoyeuses de nombreux handicaps (150 000 accidents vasculaires cérébraux par an et 7000 amputations majeures par an en France). L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) touchait plus de 200 millions de personnes dans le monde en 2010, avec une incidence en augmentation parallèlement au vieillissement de la population (+ 24% entre 2000 et 2010) puisqu'elle touche jusqu'à 49% des patients au-delà de 84 ans (2).

Majoritairement étudiée dans le territoire coronarien, la pathologie athéromateuse est pourtant une pathologie systémique, polyartérielle, et se manifeste par un large panel de symptômes regroupés en différents syndromes : cardiopathie ischémique, artériopathie des troncs supra aortiques, artériopathie oblitérante des membres inférieurs pour les plus fréquents, artériopathie des troncs digestifs et rénaux plus rarement. L'atteinte de l'un de ces territoires chez un patient nécessite la mise en place de mesures physiques et thérapeutiques de prévention secondaire. La prévention des facteurs de risque cardiovasculaires, les traitements anti-agrégants plaquettaires et les statines ont largement fait la preuve de leur efficacité dans ce domaine. Les patients présentant une AOMI sont une population à haut risque d'événements cardio-vasculaire et d'amputation (3), risque corrélé avec la sévérité de la pathologie et l'indice de pression systolique (IPS). Cependant, parmi les patients atteints d'AOMI au stade d'ischémie d'effort, seul 3 à 5 % sont susceptibles de basculer au stade d'ischémie critique chronique (4), et les facteurs de risques prédictifs d'évolution défavorables sont actuellement mal connus. La recherche de facteurs prédictifs et de scores décisionnels contribue à améliorer la prise en charge globale de ces patients que l'on ne peut - à l'heure actuelle - guérir de cette maladie pandémique.

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire

L'athérosclérose dérive d'un processus inflammatoire chronique au sein de la paroi artérielle. Les lipoprotéines oxydées (ox-LDL) présentes sous l'intima de la paroi vasculaire vont activer la réponse immunitaire innée et adaptée, entraînant l'activation des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires. Ces dernières vont recruter par chimiotactisme lymphocytes T et monocytes sous l'intima. Les monocytes se transforment alors en macrophages et ingèrent les ox-LDL, se transformant ainsi en cellules spumeuses. L'accumulation de cellules spumeuses aboutit progressivement à la formation de la plaque d'athérome. Les cytokines relarguées par les différentes cellules effectrices de l'inflammation vont localement activer ou stabiliser le processus inflammatoire (5,6).

Rôle des monocytes et des macrophages

Les macrophages sont des cellules inflammatoires de l'immunité innée qui ont un rôle clé dans l'instigation et la progression de la maladie athéromateuse. Une fois transformées en cellules spumeuses, elles synthétisent des cytokines qui vont attirer les lymphocytes T et les plaquettes au sein de la plaque d'athérome.

Ces cellules contribuent aussi à l'apparition des calcifications au sein des plaques (7). Elles sont capables de relarguer des vésicules matricielles qui pourraient médier la nucléation phosphocalcique (8), et peuvent se transdifférencier en cellules pseudo-ostéoclastiques. De plus, sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires, les macrophages synthétisent et libèrent des métalloprotéases (MMPs). Les MMPs dégradent la matrice collagénique des plaques, favorisant l'apparition de microcalcifications et aboutissant à la fragilisation puis la rupture de la plaque (9,10).

La population des macrophages CD68+ se sous-divise en plusieurs types qui ont des rôles différents et parfois antagonistes (11). On distingue notamment chez l'Homme les macrophages M1 et M2 (12). Leur répartition est différente selon les territoires vasculaires : les carotides présentent plus de macrophages M1 tandis que les macrophages M2 infiltrent plus les artères fémorales (13).

Rôle des lymphocytes B

L'immunité adaptative entre aussi en jeu dans l'évolution de la plaque d'athérome. En effet, le rôle des lymphocytes T a été longuement étudié et détaillé dans la littérature : par le maintien d'une inflammation locale active, les lymphocytes T entretiennent la progression de la maladie athéromateuse (14,15).

Le rôle des lymphocytes B (cellules CD20+) est quant à lui moins bien déterminé et probablement plus secondaire. Ces cellules sont présentes en nombre beaucoup plus restreint au sein des plaques. Il a pu être démontré que les ox-LDL servent d'antigènes pouvant activer des lymphocytes B spécifiques, qui produisent alors des anticorps dirigés contre ces antigènes. Ces anticorps anti-oxLDL inhiberaient alors l'ingestion des lipoprotéines oxydées par les macrophages et diminueraient la formation de cellules spumeuse au sein de la plaque.

De façon semblable aux macrophages, des sous-populations de lymphocytes ont été décrites. Les lymphocytes B1 sécrètent des IgM et auraient un rôle athéroprotecteur (16) tandis que les LB B2 qui sécrètent des IgE et des IgG seraient pro-athéromateux (études sur modèles murins) (17).

Mieux connus dans les modèles murins, les effets des lymphocytes B sur le risque d'accident vasculaire cérébral (AVC) et sur la fonction myocardique après infarctus a pu être démontré chez l'homme (18–21).

Ces caractéristiques inflammatoires de la plaque constituent des pistes thérapeutiques tangibles. Ainsi, notons que le Canakinumab est une immunothérapie anti-IL-1b actuellement en cours d'essai thérapeutique pour la prévention des complications et des événements secondaires après infarctus du myocarde (22).

Concernant les plaques périphériques, il est noté une différence notable de cellularité des plaques : l'infiltration par les cellules inflammatoires est plus importante dans les plaques carotidiennes que dans les plaques fémorales (23). La problématique actuelle est de savoir si cette différence constitue ou pas un facteur prédictif d'événements cardiovasculaires.

Les calcifications vasculaires

La description des différences de constitution histologique des plaques d'athérome a été établie initialement dans le territoire coronarien, et la publication par l'American Heart Association (AHA) (24) d'une classification permet notamment de distinguer les plaques lipidiques des plaques fibreuses et calcifiées (25). A l'inverse des plaques riches en lipides et en cellules inflammatoires, prônes à la rupture (26), les plaques fibreuses et calcifiées sont plus rigides mais aussi plus sténosantes (27,28). Le corollaire dans tous les territoires périphériques n'a pas encore été démontré de façon formelle mais constitue notamment une de nos hypothèses de travail. Ainsi, il a été démontré que dans le territoire carotidien, l'athérome riche en lipides et peu calcifié est associé à l'instabilité de la plaque entraînant une augmentation des événements cérébro-vasculaire (27).

En prolongation de ces travaux histologiques, les calcifications au sein de la plaque d'athérome ont été tout aussi largement étudiées dans le territoire coronarien (29), ayant abouti à l'établissement d'un score calcique : le score d'Agatston (30). Ces calcifications coronaires sont reconnues comme un facteur prédictif indépendant de morbi-mortalité en territoire coronarien (31), mais aussi de mortalité (cardiovasculaire et non cardiovasculaire) lorsqu'elles sont retrouvées dans la paroi aortique (32). Les calcifications jouent un rôle important dans la stabilité ou l'instabilité de la plaque d'athérome, et certainement dans l'aggravation de la maladie athéromateuse, en favorisant d'une part la rupture de plaques fragilisées, et en potentialisant d'autre part les conséquences de l'hypertension sur les artères.

Les calcifications vasculaires apparaissent majoritairement avec le vieillissement des artères, en lien avec l'athérosclérose ou avec des maladies métaboliques (insuffisance rénale terminale, diabète de type 2), plus rarement dans le cadre de maladies génétiques. Si les cellules inflammatoires favorisent localement l'apparition des calcifications vasculaires (rôle des vésicules matricielles, rôle des cytokines inflammatoires sur la minéralisation des tissus) (33,8,34), ces dernières ont également certainement un rôle dans le maintien d'une inflammation locale active (35,36).

L'apparition des calcifications dans les plaques était considérée comme un processus passif, jusqu'à ce que soit démontré, *a contrario*, que ce processus hautement régulé reprend des caractéristiques spécifiques de l'ossification endochondrale (37). On y retrouve notamment des protéines typiques de l'os (collagène de type I, ostéocalcine, ostéopontine, phosphatase alcaline, Runx2), et des structures osseuses typiques de pseudo-moëlle, la métaplasie ostéoïde. L'ostéogenèse des calcifications dépend notamment de la triade OPG/RANK/RANKL (OPG : ostéoprotégérine ; RANK : Récepteur Activateur du Necrosis Factor kappa – B ; RANKL : ligand de RANK) qui est détaillée succinctement ci-dessous (38,39).

Il existe plusieurs hypothèses concernant l'apparition et l'évolution de ces calcifications. Les observations actuelles nous permettent de dire que ces calcifications comprennent plusieurs sous-types, dont la répartition est hétérogène en fonction des territoires périphériques étudiés (23). Il est reconnu et retenu quatre sous-types de calcifications (différences histologiques morphologiques et moléculaires) : les microcalcifications, les nodules, les calcifications fibreuses (sheet-like) et la métaplasie ostéoïde (MO) (figure 1).

- Les microcalcifications consistent en des structures pseudo-vésiculaires de moins de 50µm de diamètre, entourées de dépôts calciques.
- Les calcifications fibreuses ou sheet-like sont définies par des dépôts calciques au sein de zones fibreuses et entourés de micronodules.

- Les nodules correspondent à un phénomène d'agrégation de dépôts calcaires multinodulaires stratifiés avec très peu de cellules.
- La métaplasie ostéoïde est définie par la présence de cellules pseudo-ostéoblastiques et pseudo-ostéocytaires entourées d'une structure extracellulaire dense et aux caractéristiques ostéoïdes, faite de collagène (structure osseuse lamellaire mature). Y sont associées des structures lipidiques et vasculaires semblables à la moelle osseuse.

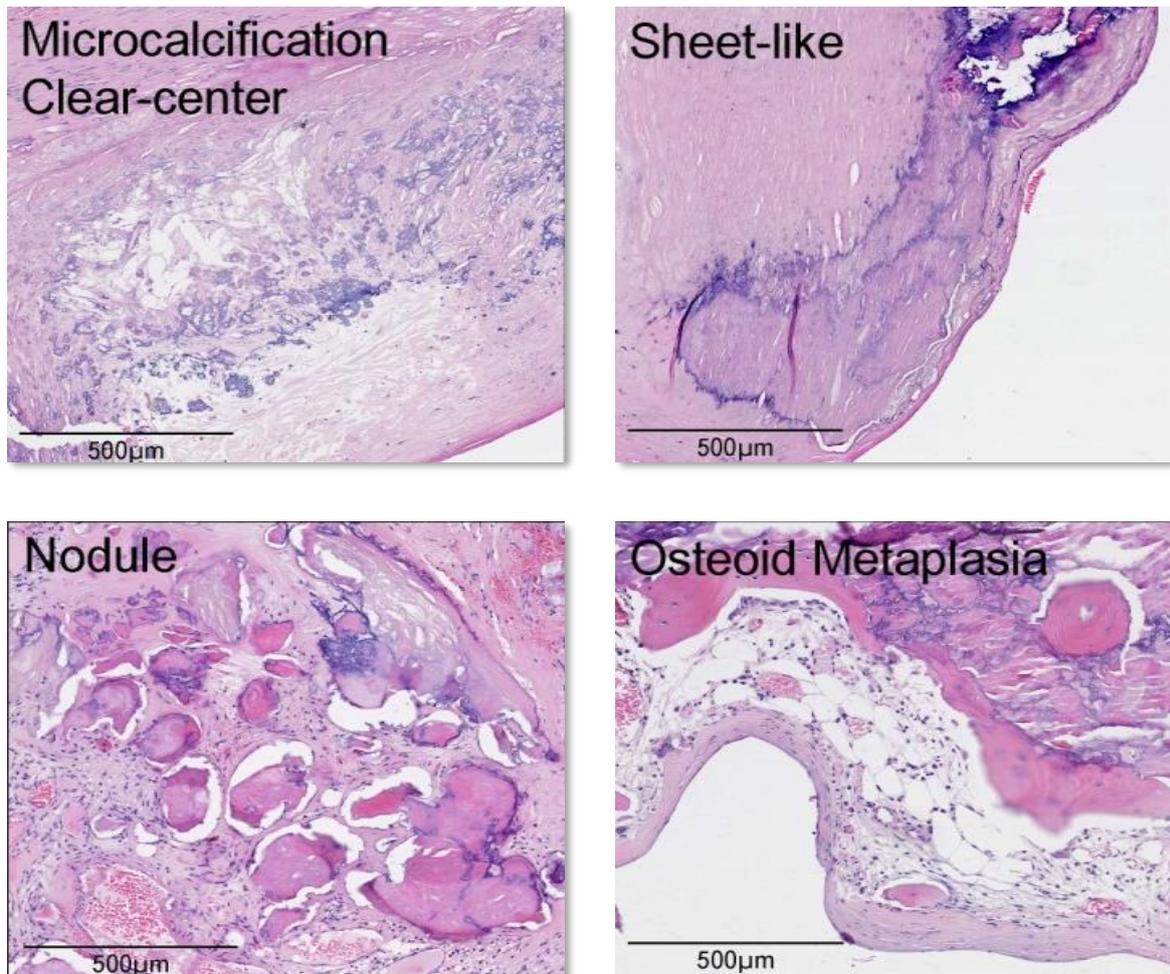


Figure 1. Aspects microscopiques des quatre sous-types de calcifications retrouvées au sein des plaques d'athérome fémorales. Coloration à l'éosine.

Ces différentes formes cohabitent fortement au sein d'une même plaque, bien qu'il n'y ait pas de relation chronologique entre elles (40). On note cependant que la MO est fortement associée aux territoires fémoral et infra-poplitée, de façon spécifique. Les hypothèses formulées pour expliquer ces différences de calcification sont de trois niveaux :

- La première hypothèse évoquée est relative à une différence moléculaire intrinsèque (41,42). Cette hypothèse de travail est soutenue par la démonstration de différences embryologiques entre les territoires artériels (43) ; différences d'origines qui

pourraient expliquer la divergence de cellularité et de réponse inflammatoire/procalcifiante entre les territoires artériels.

- La deuxième ligne d'hypothèses est relative aux éléments extrinsèques à la plaque d'athérome. On notera notamment une différence d'exposition aux facteurs de risques avec des corrélations particulières entre tabac et AOMI, entre hypertension et AVC, entre diabète et atteinte distale.
- Les études rhéologiques (44) menées dans les cadres des thromboses artérielles nous ont amené à formuler un troisième type d'hypothèse, relative au facteur hémodynamique. Il a été reconnu que les changements de diamètre, les bifurcations vasculaires et autres variations anatomiques entraînent des différences hémodynamiques qui participent au tiraillement pariétal ou shear-stress (36). Ce tiraillement provoque tout d'abord des exacerbations de tension pariétal sur des artères pathologiques, entraînant la rupture de plaques instables et calcifiées. De plus, le tiraillement provoque des modifications moléculaires manifestes au sein de l'intima, sans que l'on ne sache encore formellement comment ce facteur hémodynamique joue sur la composition intrinsèque de la plaque d'athérome et sur son degré de calcification.

Les biocollections ECLA et ECLAGEN

Afin de contribuer à l'effort mondial sur l'étude de l'artériopathie périphérique, notre service de Chirurgie Vasculaire du CHU de Nantes est en collaboration étroite avec le laboratoire Phy-Os (unité Inserm UMR_1238). Cette collaboration a abouti à l'élaboration d'une biocollection unique en son genre. Au cours de la décennie précédente, les équipes chirurgicales et les chercheurs ont prélevé et analysé 325 échantillons de plaques d'athérome issus de cinq territoires artériels périphériques différents (aorte thoracique et aorte abdominale, artères carotide, fémorale, axes de jambes) ainsi que les plasmas des patients, répartis en deux biocollections : ECLA et ECLAGEN. Ces données de patients ont été comparées à celles de 80 donneurs sains grâce aux artères de ces mêmes territoires périphériques et aux plasmas qui ont pu être collectés lors de prélèvements multi-organes.

Cette biothèque complète et riche nous a permis de comparer des données histologiques (23) mais aussi génomiques (ECLAGEN) entre différents territoires athéromateux périphériques. En résumé, les analyses conduites nous ont permis de prouver la différence de constitution entre plaques carotidiennes et plaques fémorales, à plusieurs échelles.

A l'échelle histologique

Au niveau carotidien, les plaques sont fortement lipidiques avec un taux important de cholestérol. Elles sont aussi très cellularisées avec une relative importance de l'infiltration en cellules inflammatoires. Les calcifications plus fréquemment rencontrées sont les microcalcifications. Les facteurs associés à la stabilité des plaques carotidiennes sont un taux d'ostéoprotégérine sérique faible, la présence de métaplasie ostéoïde au sein des calcifications et la présence de péricytes.

Au niveau fémoral, les plaques sont plus riches en calcium et peu cellularisées. Les calcifications les plus fréquentes sont les nodules et la métaplasie ostéoïde. Elles correspondent aux plaques fibro-calciques de la classification AHA (23,45).

A l'échelle moléculaire

Des analyses moléculaires préliminaires ont attiré notre attention sur la triade OPG/RANK/RANKL. Cette triade joue un rôle essentiel dans le métabolisme osseux. RANK est exprimé à la surface cellulaire des ostéoclastes, qui sont alors activés lorsque son ligand extracellulaire RANKL se fixe à RANK. OPG est un récepteur soluble extracellulaire qui vient fixer préférentiellement RANKL, inhibant alors la différenciation, l'activation des ostéoclastes et *a fortiori* la résorption osseuse. Le ratio OPG/RANK définit un indice de remodelage osseux (46,47).

OPG est exprimée de façon constitutive par le système cardiovasculaire, notamment par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires, mais aussi par les macrophages après activation de ceux-ci par des cytokines pro-inflammatoires. *In vitro*, OPG inhibe la minéralisation induite par ces types cellulaires. OPG est associée à la mortalité cardiovasculaire en territoire coronarien, mais aussi en territoire périphérique dans le cadre des sténoses carotidiennes symptomatiques. A l'inverse, RANK et RANKL ne sont pas retrouvés dans les tissus vasculaires sains.

Au sein des plaques d'athérome, OPG est exprimée de façon plus importante dans les plaques carotidiennes, et proche des cores lipidiques et des calcifications. RANK et RANKL sont exprimés dans les plaques d'athérome, associés aux cores lipidiques à l'étage carotidien et aux calcifications à l'étage fémoral.

A l'échelle transcriptomique

L'hétérogénéité de répartition des calcifications dans les territoires artériels périphériques n'est pas en lien avec des différences d'expositions aux facteurs de risques cardiovasculaires. Cette hétérogénéité histologique se retrouve confirmée à l'échelle génétique et épigénétique. Les gènes du système immunitaire sont plus fortement exprimés dans les artères carotides tandis que les artères fémorales expriment plus fortement des gènes du développement osseux et de la fonction musculaire (48).

Les cellules musculaires lisses vasculaires (CML) ont une forte tendance à minéraliser le milieu extracellulaire lorsqu'elles sont exposées *in vitro* à un milieu pro-calcifiant. Les CML humaines isolées à partir d'artères fémorales de donneurs sains ont un potentiel de minéralisation plus fort que les CML de carotides et d'artères infra-poplitées. A l'échelle transcriptomique, cette différence est expliquée par la surexpression de gènes impliqués dans la cascade du *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β).

Relation translationnelle

A notre connaissance, les différences de calcifications artérielles périphériques n'ont pas fait la preuve de leur impact sur le devenir clinique des patients (49–52).

Le caractère innovateur du présent travail consistait à comparer les données histologiques et biologiques / épigénétiques des plaques d'athérome aux données cliniques, dans le but de définir d'éventuels marqueurs pronostiques de l'évolutivité de l'AOMI.

Problématique et but de notre étude

Les calcifications exacerbent la rigidité des artères élastiques devenues pathologiques, participant de fait au cercle de l'hypertension artérielle essentielle et de ses manifestations cliniques systémiques. En diminuant la compliance des artères de moyen et gros calibre, elles peuvent alors participer à provoquer la rupture de plaques fragiles dans d'autres territoires vasculaires.

Les calcifications ont aussi un impact local plus direct sur les traitements. Lorsque les plaques d'athérome sont symptomatiques dans les territoires périphériques, la présence de calcifications entraîne des difficultés techniques notables lors des traitements par chirurgie conventionnelle et par techniques endovasculaires. Les sutures sur artères calcifiées sont plus longues et plus difficiles, plus promptes à développer des complications secondaires (fuites, faux-anévrysmes, resténoses précoces). Les techniques de recanalisations endoluminales ou subintimales sont rendues complexes par ces calcifications, qui peuvent entraîner un recoil important après dilatation au ballon, provoquer à plus ou moins long terme des fractures de stents, et diminuer l'efficacité des ballons et stents à élution médicamenteuse.

Les résultats péri-opératoires et au long terme après chirurgie du trépied fémoral sont décrits dans la littérature (53–58), et seront détaillés comparativement à notre population.

Il existe toutefois peu de données dans la littérature concernant les événements cardiovasculaires secondaires chez ces patients. Certains facteurs prédictifs de survie ont été décrits (la CRP, l'interleukine-6) (59), mais aucun biomarqueur associé à un risque de resténose locale, à un risque de réinterventions et d'amputation, ou à un risque d'événements cardiovasculaires systémiques secondaires n'est décrit à notre connaissance dans la littérature. Cela permettrait de définir des critères histologiques prédictifs de survenue d'événements indésirables secondaires, afin de sélectionner activement les patients pour une surveillance renforcée et une prévention secondaire améliorée.

L'objectif principal de cette étude de cohorte était de rechercher des marqueurs histologiques pronostiques de la plaque d'athérome pouvant permettre de discriminer les patients à haut risque de récurrence et/ou à haut risque d'événements cardiovasculaires généraux parmi une population de patients opérés d'une endartériectomie du trépied fémoral. L'objectif secondaire était de rapporter les résultats péri-opératoire et à 5 ans de la prise en charge par chirurgie du trépied fémoral.

MATERIEL ET METHODE

Ethique

L'établissement de la cohorte ECLA-LT a été approuvé par le comité d'éthique locale (protocole de recherche #PFS09-014, autorisation du 23/12/2009 par l'Agence de Biomédecine ; Ministère de la Recherche n° DC-2008-402 ; CNIL n° 1520735 v 0). Tous les patients vivants ont été contactés afin de leur délivrer l'information nécessaire et de recueillir leur consentement écrit, libre et éclairé ; pour les patients décédés, leur consentement était accordé de fait tandis que les familles des personnes donneurs d'organes ont été consultées pour recueillir leur accord.

Population

L'étude ECLA-Long Term (ECLA-LT) consistait en un suivi de cohorte monocentrique, avec analyse longitudinale et rétrospective de données prospectives. Les patients sélectionnés étaient déjà inclus dans les protocoles ECLA et ECLAGEN (cf. ci-dessous) ; ECLA-LT regroupait les patients de ces deux biocollections, issues de patients qui ont bénéficié d'un traitement chirurgical par endartériectomie du trépied fémoral, pour des lésions athéromateuses *de novo*. Le suivi clinique et paraclinique de ces patients a été recueilli et analysé, dans l'objectif de définir des marqueurs biologiques et/ou histologiques de l'évolution locorégionale et systémique de l'athérosclérose chez ces patients.

Entre 2008 et 2010, 118 patients ont été inclus dans la cohorte ECLA (Etude Comparative des Lésions Athéromateuses) permettant de réunir du plasma et des plaques athéromateuses issues des territoires carotidiens et fémoraux dans une première biocollection unique en son genre. Une biocollection complémentaire appelée ECLAGEN (Etude Comparative des Lésions Athéromateuses et GENétique, inclusions entre 2012 et 2015) a permis de compléter la première avec 207 échantillons, provenant des artères carotides et fémorales, mais aussi des artères de jambe, de l'aorte thoracique et abdominale ; une partie de ces échantillons ont été analysés par puces transcriptomiques afin de définir la signature génétique et épigénétique de ces différents territoires athéromateux. De façon novatrice, la biocollection ECLAGEN comprenait également 80 échantillons artériels de différents territoires périphériques (carotide, aorte thoracique, aorte abdominale, fémorale et poplitée) provenant de donneurs sains (prélèvements multi-organes) constituant un pool de témoins négatifs.

Les critères d'inclusion pour les cohortes ECLA et ECLAGEN étaient : patient de plus de 18 ans en capacité physique et mentale de donner et signer un consentement éclairé, bénéficiant d'une chirurgie artérielle ouverte pour des lésions athéromateuses *de novo* concernant les cinq territoires artériels suscités ; patients en état de mort encéphalique et donneurs d'organes. L'inclusion dans la cohorte ECLA-LT se limitait aux patients opérés pour des lésions du trépied fémoral, soit 44 patients de ECLA et 50 patients de ECLAGEN pour 47 et 54 membres inférieurs (7 chirurgies bilatérales). Parmi ces patients, une personne a refusé de donner son consentement, tandis que trois autres dossiers ont été exclus pour des indications chirurgicales aberrantes. Au total, la cohorte ECLA-LT comprend 90 patients et 97 membres inférieurs traités.

Les données cliniques préopératoires ont été collectées de façon rétrospective dans les dossiers médicaux, pour les éléments suivants :

- Antécédents médicaux
- Traitements préopératoires
- Classification Rutherford (60) et IPS
- Données échographiques de la lésion opérée
- Numération-formule sanguine (NFS).

Les données de l'intervention chirurgicale : gestes opératoires complets, anesthésie, durée d'hospitalisation, ont également été colligées, tout comme les complications locales et systémiques grevant la période péri-opératoire (définie par les 30 jours postopératoires).

De plus, les données suivantes systémiques et loco-régionales ont été recueillies de façon rétrospective et prospective à 1 mois, 6 mois, 12 mois, puis tous les ans jusqu'à 5 ans après l'intervention :

- Mortalité globale
- MACE :
 - Mortalité cardiovasculaire
 - Événement cérébro-vasculaire (AIT ou AVC)
 - Infarctus du myocarde
 - Angor instable
- MALE :
 - Amputation majeure du membre index
 - Réintervention majeure (comme définies dans le critère MALE, cf. ci-dessous)
- Classification Rutherford, l'IPS
- Degré de perméabilité à l'échographie

Recueil et conditionnement des échantillons humains

Les plaques d'athérome prélevées au niveau du trépied fémoral lors d'interventions chirurgicales étaient traitées de la façon suivante (23,47) :

- Ablation de l'adventice et section de l'échantillon en quatre segments longitudinaux.
- Fixation immédiate dans du formol à 4% puis inclusion en paraffine pour analyses histologiques, ou ;
- Fixation dans du paraformaldéhyde puis inclusion dans de l'OCT® pour analyses histologiques, ou ;
- Stockage à -80°C dans une solution de RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Hilden, Allemagne) puis extraction des ARNm pour analyse du transcriptome, ou ;
- Stockage à -80°C pour extractions ultérieures des protéines et analyse du protéome.

Pour les études histologiques, il a été réalisé dix sections en série de 3µm d'épaisseur en partie centrale de la lésion athéromateuse. Des marquages successifs à l'hématoxyline, à l'éosine et au trichrome de Masson ont permis de caractériser le phénotype des plaques et des

calcifications intraplaques. Quatre types de calcifications étaient distingués : les calcifications à centre clair ou microcalcifications, les calcifications fibreuses, les nodules et la métaplasie ostéoïde (cf. caractéristiques décrites dans l'introduction) (61).

Des sections complémentaires sur blocs de paraffine ont été réalisées pour les marquages immunologiques sur un large échantillon de plaques. Les macrophages étaient marqués avec un anticorps anti-CD68 (M0876, Dako®, Glostrup, Danemark) et révélés par la technique de Streptavidine – Biotine (Dako®). Les lymphocytes B étaient marqués avec un anticorps anti-CD20 (ab9475, Abcam®, Cambridge, Royaume-Uni) puis révélés par immunofluorescence. Toutes les lames ont été numérisées avec l'aide d'un scanner digital NanoZoomer (Hamamatsu Photonics®, Hamamatsu, Japon). Pour les lames CD68+, le calcul d'aire marquée a été réalisé sur le logiciel Image-Pro Plus® 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, Etats-Unis), permettant d'exprimer les résultats en pourcentage d'aire marquée sur l'aire de la plaque. Le marquage fluorescent des lames CD20+ a permis de compter manuellement les cellules positives, permettant d'exprimer les résultats en nombre de cellules CD20+/mm² de plaque.

Critères de jugement primaire et secondaires

Le critère MALE (*Major Adverse Limb Events*) constituait notre critère de jugement primaire pour les études de corrélation entre données cliniques et données histologiques. C'est un critère composite associant amputation majeure (au-dessus de la cheville) et / ou réinterventions majeures au niveau du membre inférieur index, comprenant reprise pour prolongation de pontage, révision de pontage ou thrombolyse et thrombectomie de pontage. (62).

D'autres critères de jugement secondaires ont été définis :

- Le critère composite MACE (*Major Adverse Cardiac Events*) d'une part
- Tous ses intitulés d'autre part : infarctus du myocarde, angor instable, accident ischémique cérébral transitoire, accident vasculaire cérébral, mortalité d'origine cardiovasculaire
- La mortalité globale
- Le stade Rutherford et l'IPS permettant de définir l'amélioration clinique post-opératoire (63)

Analyses statistiques

Les données continues sont présentées sous la forme moyenne \pm déviation standard (SD) ou médiane [quartiles], les fréquences sont exprimées en n (%). Les courbes de survie ont été réalisées selon la méthode de Kaplan-Meier (tests du log-rank). Une analyse de régression selon la méthode de Cox, avec calcul des Hazard Ratio (HR) et de leurs intervalles de confiance à 95% (IC95), a été utilisée pour déterminer la relation indépendante entre les données cliniques / biologiques et les critères de jugement primaire et secondaires. Le test du χ^2 ou le test exact de Fisher ont été utilisés pour comparer les variables entre les groupes.

Pour les patients décédés avant la fin du recueil ou perdus de vue, la date de dernières nouvelles correspondant au dernier échodoppler en date ou au dernier examen physique vasculaire retrouvé dans le dossier médical.

Les lames histologiques ont été lues par deux investigateurs indépendants (TQ et OE) et en aveugle, après la réalisation d'un test de concordance inter-observateurs sur quelques échantillons. Les lames d'immunohistochimie ont été lues et analysées par un observateur (AD), en aveugle par rapport à la situation clinique des patients correspondants.

Une valeur de $p < 0,05$ était considérée statistiquement significative. Les données ont été analysées avec les logiciels SAS packages (SAS Institute Inc, version 9.4, Cary, NC) et GraphPad Prism (version 6.01 pour Windows, GraphPad Software, La Jolla California, www.graphpad.com).

RESULTATS

Population

Démographie

A partir des données des cohortes ECLA et ECLAGEN, nous avons respectivement sélectionné les 44 et 50 patients qui ont été opérés d'une endartériectomie fémorale, ayant permis de recueillir 47 et 54 échantillons (respectivement 3 et 4 chirurgies bilatérales). 13 patients ont été exclus de l'analyse finale : une patiente a retiré son consentement pour participer à cette étude ; trois autres patients présentaient des indications chirurgicales aberrantes ; cinq échantillons de plaque n'ont pu être analysés histologiquement du fait de la mauvaise qualité de l'échantillon et quatre autres ont été retirés de l'analyse car ils ne présentaient aucune calcification. Finalement, la cohorte ECLA-LT est constituée de 86 échantillons de plaque athéromateuse fémorale pour 81 patients.

Les caractéristiques principales de notre population sont détaillées dans le tableau I. La médiane de suivi est de 42,4 mois [26,9 – 58,8]. La majorité des patients (76,5%, 65 membres inférieurs) souffraient de claudication intermittente (stades 2 et 3 de la classification de Rutherford) avec un indice de pression systolique (IPS) moyen avant revascularisation de $0,50 \pm 0,25$.

Les techniques chirurgicales utilisées pour la revascularisation du trépied fémoral ont été des pontages aorto-bi-fémoraux dans 9% des cas, 56% de pontages fémoro-fémoraux ou de pontages fémoro-poplités, et 35% d'endartériectomies avec reconstruction sur patch prothétique.

Résultats cliniques

Le taux de complications majeures intra-hospitalières était de 6,2% (5 patients) correspondant à un décès (à 65 jours), deux événements cardiologiques majeurs et deux amputations majeures sur le membre opéré.

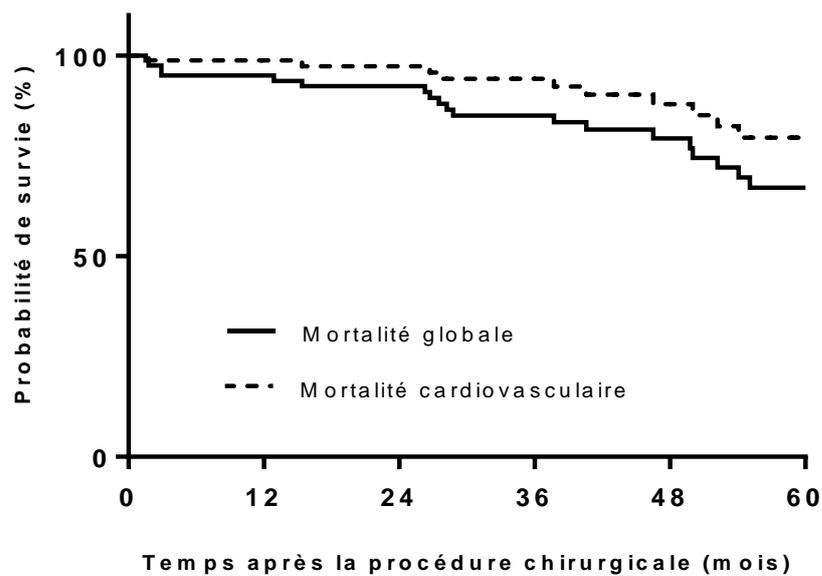
A la visite postopératoire (entre J30 et J60), 15 patients (9%) ont rapporté une amélioration clinique de +3, 39% ont rapporté une amélioration de +2 et 30% pour +1, tandis que 11% des patients n'ont pas rapporté d'amélioration clinique significative et un patient a rapporté une détérioration majeure (dégradation de sa plaie avec nécessité d'amputation distale).

A la fin du suivi (période médiane de 42,4 mois), 19 patients supplémentaires étaient décédés, dont 7 décès de cause cardiovasculaire. La survie globale était de 95% à 1 an et de 85,1% à 3 ans (figure 2).

Après 3 ans de suivi, 21%, 43% et 21% patients ont respectivement rapporté une amélioration clinique de +3, +2 et +1 ; 10 patients n'ont pas expérimenté de changement tandis que 2 patients ont rapporté une dégradation clinique de -1 (figure 3).

Comparaison à la littérature

Dans la littérature (64–69) les taux de survie sans amputation suivant cette chirurgie sont globalement bons (cf. tableau II : 90 à 100% à 5 ans), même si les taux de survie sans réintervention à 5 ans varient entre 68 et 96% (95% pour notre cohorte ECLA). Cette chirurgie est réalisée principalement chez des patients au stade de claudication intermittente, moins souvent chez des patients en ischémie critique chronique, avec une meilleure perméabilité primaire et primaire assistée et une plus longue survie sans amputation lorsque l'on compare ces deux sous-populations.



		0	12	24	36	48	60
Mortalité globale	Nombre à risque	81	71	66	52	36	15
	% survie cumulée	100%	95,0%	92,3%	85,1%	79,3%	67,0%

Figure 2. Courbes de Kaplan-Meier pour la mortalité globale et la mortalité cardiovasculaire.

Tableau I. Démographie.

	Total	MACE	<i>p-value</i>	MALE	<i>p-value</i>	Mortalité globale	<i>p-value</i>
Population, n	81 pts & 86 mbs	23 / 81 pts		18 / 86 mbs		19 / 81 pts	
Homme, n (%)	72 (89.0)	19 (83)	-	17 (94)	-	15 (79.0)	-
Âge (y), moy ± SD	67.3 ± 9.3	69.7 ± 9.4	.21	68.8 ± 8.9	.23	70.9 ± 10.7	.09
IMC (kg/m ²), moy ± SD	25.8 ± 4.8	26.5 ± 3	.74	25.4 ± 3.6	.15	25 ± 3.2	.13
Durée de suivi (m), médiane [quartiles]	42.4 [26.9 - 58.8]						
Antécédents							
Tabagisme actif ou sévère < 3 ans, n (%)	32 (40)	11 (48)	.17	8 (44)	.86	6 (32)	.86
HTA, n (%)	64 (79)	20 (87)	.86	17 (94)	.13	16 (84)	.62
Dyslipidémie, n (%)	59 (73)	17 (74)	.55	14 (78)	.65	15 (79)	.93
Diabète, n (%)	Type I	5 (6)	.12	2 (11)	.27	2 (11)	.53
	Type II	21 (26)		9 (39)		6 (33)	
Événements coronariens, n (%)	45 (56)	13 (57)	.76	10 (56)	.73	12 (63)	.55
Maladie cérébro-vasculaire, n (%)	9 (11)	7 (30)	.009*	4 (22)	.1	4 (22)	.37
Insuffisance rénale chronique, n (%)	12 (15)	5 (22)	.06	3 (17)	.36	7 (37)	.0007*
Créatininémie (µmol/L, moy ± SD)	92.2 ± 58.8	92.3 ± 41.1	.18	89.2 ± 47.5	.87	129.9 ± 104.2	.0002*

Traitements								
Statines, n (%)		66 (81)	18 (78)	.43	15 (83)	.82	17 (89)	.95
Anti-agrégants plaquettaires, n (%)		72 (89)	21 (91)	.63	15 (83)	.31	14 (74)	.10
AOMI								
Rutherford, n (%)	1 - 3	62 (77)	15 (65)		11 (61)		9 (47)	
	4	7 (9)	3 (13)	.14	2 (11)	.06	2 (11)	.38
	5 - 6	12 (15)	5 (22)		5 (28)		8 (42)	.001*
IPS, moy ± SD		0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.3	.57	0.6 ± 0.3	.28	0.6 ± 0.3	.95
Procédure chirurgicale								
Endartériectomie et fermeture sur patch, n (%)		28 (35)	6 (26)		5 (28)		5 (26)	
Pontage fémoral homolatéral, n (%)		46 (57)	14 (61)		11 (61)		13 (68)	
Pontage aorto-bifémoral, n (%)		7 (9)	3 (13)		2 (11)		1 (5)	
Durée d'hospitalisation (j), médiane [quartiles]		8 [7 - 10]	9 [7 - 15]		13.3 [8 - 14]		10 [7 - 17]	

Légende : la première colonne des résultats présente la cohorte entière, ensuite séparée en sous-groupes s'intéressant aux patients ayant présenté les événements MACE, MALE ou mortalité globale.

Tous les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SD ou médiane [quartiles] pour les données continues, et sous la forme nombre de patients (n) (pourcentage) pour les fréquences. Les p sont considérés comme statistiquement significatifs quand <0,05 (*). Les p ont été obtenus par des régressions univariées de Cox avec stratification sur la cohorte et le genre.

Abréviations : MACE = *major adverse cardiac events*, incluent la mortalité cardiovasculaire, l'angor instable, l'infarctus du myocarde ou la survenue d'un accident vasculaire cérébral ; MALE = *major adverse limb events* incluent les amputations majeures (au-dessus de la cheville) et les réinterventions majeures

sur le membre inférieur index ; moy = moyenne ; a = années, m = mois, j = jours, IMC = indice de masse corporelle, HTA = hypertension, AOMI = artériopathie oblitérante des membres inférieurs, IPS = index de pression systolique, pts = patients, mbs = membres inférieurs, n/a = non applicable.

Tableau II. Tableau comparatif des données de la littérature de cohortes de patients opérés au niveau du trépied fémoral avec les résultats de notre cohorte.

Nom de l'étude	Mukherjee et al.	Springhorn et al.	Cardon et al.	Nelson et al.	Kechagias et al.	Kang et al.	Ballotta et al.	ECLA	ECLA-LT
Année de publication	1989	1991	2001	2002	2007	2008	2009	2016	2019
Population									
Patients (n)	29	22	101	34	90	58	117	42	90
Mbs inférieurs (n)		29	110		111	65	121	45	97
Suivi (mois)		37	43		71	27	50,5	59,1	42,7
Symptômes									
Claudication intermittente (%)	59,0	31,0	48,0	50,0	69,4	68,0	60,0		78,0
Ischémie critique (%)	41,0	69,0	52,0	50,0	30,6	32,0	40,0		22,0
Données péri-opératoires									
Durée de séjour hospitalier (jours)						3,2	3,3		8,0
Mortalité intra-hospitalière (%)	0	0	1,0		1,8		0		1,1
Complications majeures (%)	0		3,6		0	5,0	0		5,6
Résultats cliniques									
Amélioration de l'IPS		+0,18				+0,24	+0,37		+0,25
Amélioration du stade Rutherford à 5 ans (%)						25,0	71,0		23,0
						66,0	39,0		37,5
						8,0			20,8
						1,0			12,5

	-1									6,2
Suivi										
Perméabilité primaire (%)	1 an			84		93		100		94
	3 ans		82	95				99		85
	5 ans	90	74	89		91		96		
Perméabilité primaire assistée (%)	1 an			97				100		
	3 ans							100		
	5 ans	94	90			100		100		
Survie sans revascularisation (%)	1 an					82		100		87 88
	3 ans		82					96		72 76
	5 ans			96	68	78		82		59
Survie sans amputation (%)	1 an									100 97
	3 ans									100 96
	5 ans	100	23	92	94	100		100		97 95
Survie globale	1 an					89		100		100 96
	3 ans			88				97		92 87
	5 ans		46	68	61	70		89		73

Légende : tableau comparatif des cohortes de la littérature avec les données de notre cohorte, pour les patients opérés au niveau de l'artère fémorale commune. Les patients opérés sont majoritairement claudicants ; les complications péri-opératoires sont de l'ordre de 3 à 6% pour une mortalité intra-hospitalière entre 1 et 2%. Concernant le suivi, la perméabilité primaire de notre cohorte est comparable aux autres cohortes, malgré un plus fort taux de revascularisation secondaire, ce qui permet d'empêcher la survenue d'amputation majeure chez plus de 92% des patients à 5 ans.

IPS : index de pression systolique ; Mbs : membres.

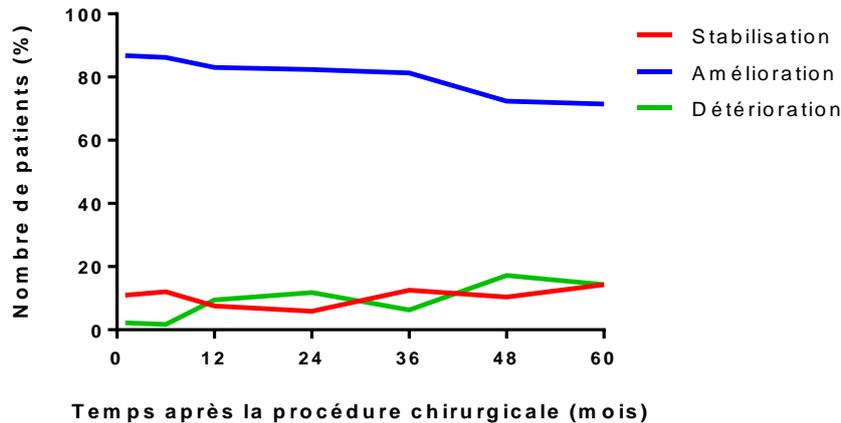


Figure 3. Courbes de l'évolution de l'amélioration clinique selon la classification de Rutherford. La plupart des patients ont rapporté une amélioration de +1 à +3. Cette amélioration clinique post-opératoire a une certaine durabilité dans le temps, malgré net un infléchissement de la courbe après 3 ans.

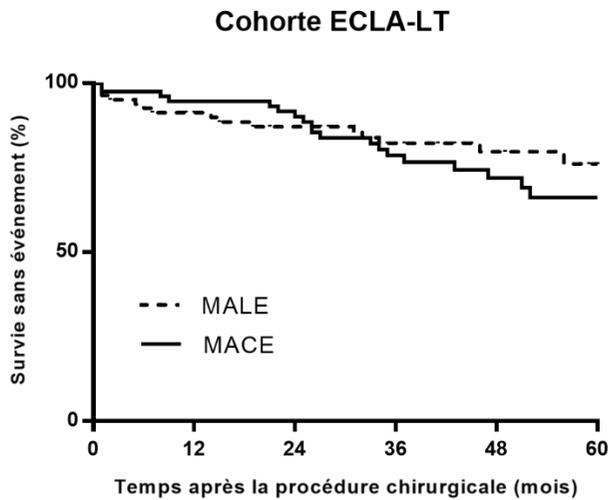
Survenue de MACE et MALE

Vingt-trois patients (28,4%) ont subi un événement cardiologique majeur (MACE, figures 4 et 5) au cours du suivi, comprenant 7 AVC, 9 infarctus du myocarde, 5 angors instables et 2 décès d'origine cardiovasculaire. L'étude des facteurs de risque a montré qu'un antécédent d'AVC ou la présence d'une insuffisance rénale chronique étaient significativement associés à la survenue d'un MACE au cours du suivi (30%, $p=0,001$ et 22%, $p=0,03$, respectivement).

Dix-sept patients (21%) ont subi un événement majeur sur le membre cible (MALE, figures 4 et 6) dont un patient qui a été repris chirurgicalement pour prolongation de pontage sur les deux membres inclus. Sept patients ont présenté à la fois un MACE et un MALE. La répartition des MALE est la suivante :

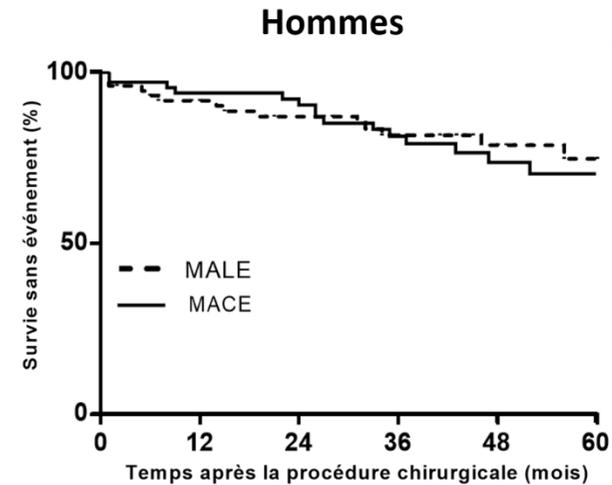
- 6 reprises chirurgicales pour resténose symptomatique
- 4 amputations majeures (médiane de survenue à 66 jours [19,5 – 913])
- 4 pontages complémentaires plus distaux
- 2 reprises pour infection de pontage nécessitant un remplacement par allogreffe
- 1 fermeture chirurgicale de faux-anévrismes sur l'anastomose proximale
- 1 thrombectomie de pontage

A l'exception de la classification Rutherford, aucune des caractéristiques de la population n'a été corrélée à la survenue d'un MALE.



		0	12	24	36	48	60
MACE	Nombre à risque	81	66	60	42	29	12
	% survie cumulée	100%	91,1%	86,7%	75,7%	69,2%	63,6%
MALE	Nombre à risque	86	68	59	45	31	14
	% survie cumulée	100%	88,1%	84,1%	79,3%	76,9%	73,3%

A.



		0	12	24	36	48	60
MACE	Nombre à risque	72	58	53	39	26	12
	% survie cumulée	100%	90,0%	86,7%	77,9%	70,6%	67,4%
MALE	Nombre à risque	77	61	52	40	26	14
	% survie cumulée	100%	88,1%	83,6%	78,3%	75,5%	71,6%

B.

Figure 4. Courbes de survie sans événement MACE et MALE. **(A.)** Courbe de Kaplan Meier de toute la population de la cohorte ECLA-LT. **(B.)** Courbe de Kaplan Meier pour la sous-population des hommes. Le genre semble influencer sur la survenue des événements cardiovasculaires post-opératoires dans la littérature (70), mais pas dans notre cohorte (seulement 9 femmes dans la cohorte).

Abréviations : MACE = *major adverse cardiac events*, incluent la mortalité cardiovasculaire, l'angor instable, l'infarctus du myocarde ou la survenue d'un accident vasculaire cérébral ; MALE = *major adverse limb events* incluent les amputations majeures (au-dessus de la cheville) et les réinterventions majeures sur le membre inférieur index.

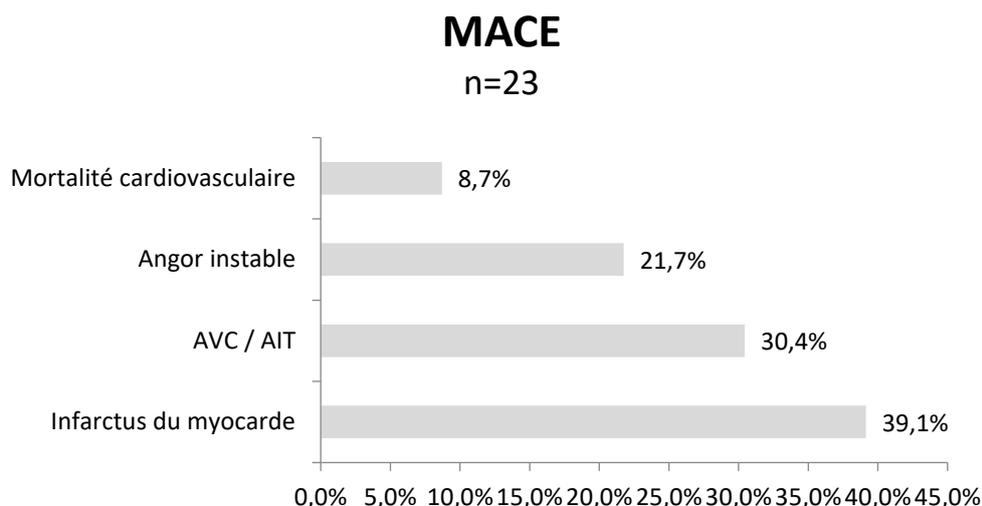


Figure 5. Survenue d'un *major adverse cardiac events* (MACE), dont les critères sont détaillés dans la figure. Vingt-trois patients (28,4%) de la cohorte ont souffert d'un événement MACE.

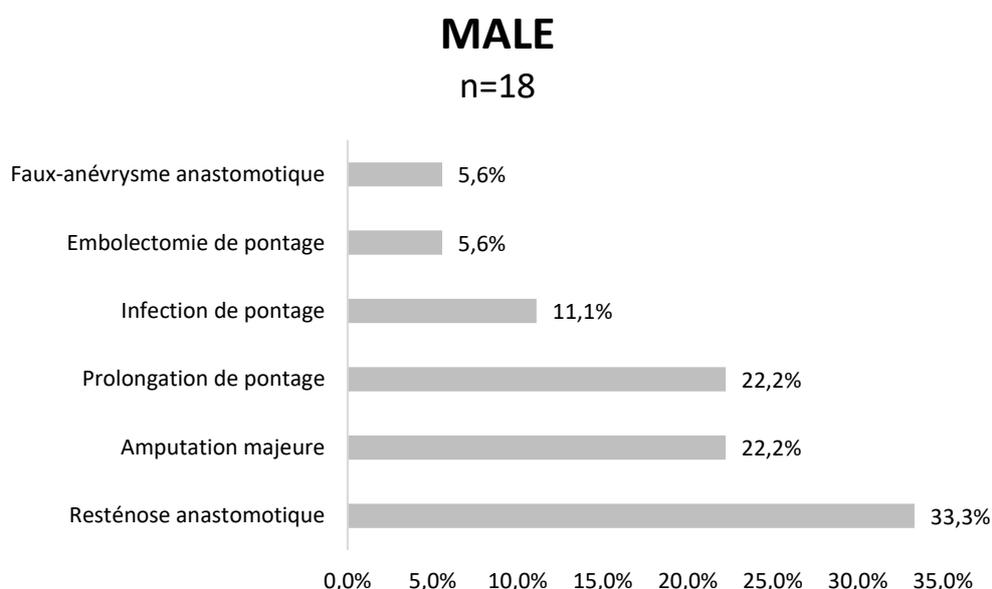


Figure 6. Survenue d'un *major adverse limb event* (MALE), dont les critères sont détaillés dans la figure. 17 patients (21%) de la cohorte ont nécessité une réintervention sur 18 membres (un patient a été réopéré des deux côtés).

Impact du type de calcification sur la survenue d'un MACE ou d'un MALE

86 échantillons de plaques prélevées chez 81 patients ont pu être analysées en histologie (tableau III). De la métaplasie ostéoïde a été retrouvée dans 41 (soit 51%) de ces échantillons (cf. figure 1). Une grande majorité des échantillons (78% et 81% respectivement) présentaient des calcifications fibreuses (*sheet-like*) et nodulaires.

Parmi les caractéristiques préopératoires des patients, l'âge était associé à la présence de MO ($69,8 \pm 9,5$ vs $64,6 \pm 8,5$, $p=0,01$) tandis que le tabagisme actif ou sévère était associé à l'absence de MO ($p=0,01$). Le sexe n'était pas un facteur discriminant dans la répartition des

calcifications. Les analyses statistiques multivariées par modèles de Cox, ajustées sur le sexe et la cohorte (ECLA et ECLAGEN) n'ont pas permis de retrouver de corrélation directe entre la MO ou les microcalcifications et la survenue d'un MACE ou d'un MALE. Les calcifications fibreuses (*sheet-like*) avaient une tendance à l'association avec MACE ($p=0,04$) mais pas les nodules. La survenue d'un MALE était plus fréquente pour les patients avec des plaques sans nodules ($p=0,003$).

Impact de l'inflammation biologique et histologique

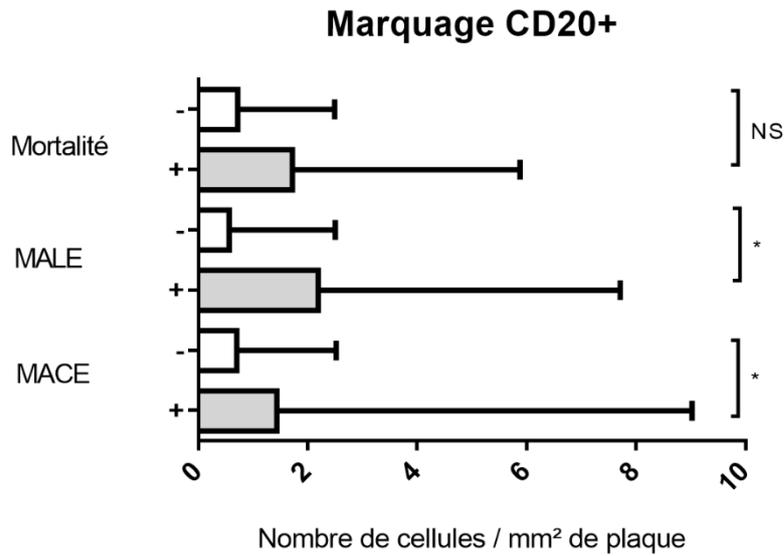
L'analyse des numérations et formules sanguines préopératoires des patients de la cohorte ECLA ($n=38$, tableau III) a montré en analyses multivariées que la numération de neutrophiles était significativement plus haute chez les patients ayant rapporté un MALE ($p=0,0003$). Ces résultats ont été corroborés aux analyses immunohistochimiques d'infiltration de la plaque par les cellules médiatrices de l'inflammation (tableau III, figure 7). Ainsi, le marquage CD20+ (marqueur des lymphocytes B) était plus important dans les plaques de patients ayant subi un MACE (HR 1,08 [1,00 – 1,17] ; $p=0,04$) ou un MALE (HR 1,06 [1,01 – 1,13] ; $p=0,03$) (figures 7A et 8) ; *a contrario* il n'a pas été retrouvé de corrélation directe entre l'infiltration par les monocytes (marquage CD68+) et la survenue d'événements cardiovasculaires (figure 7B et 9).

Tableau III. Caractéristiques histologiques des plaques et données biologiques des patients de la cohorte et des sous-groupes de patients ayant présenté un MACE et un MALE.

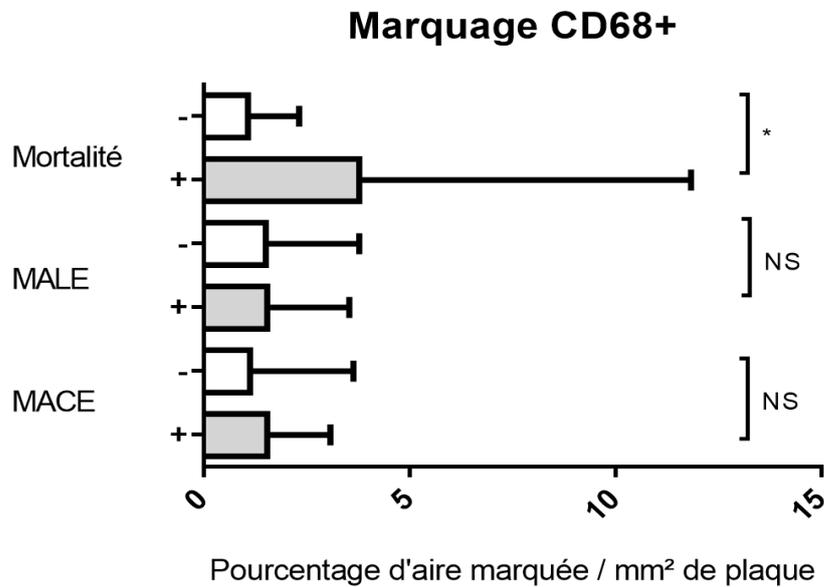
	Total (81)	MACE (23)	P-value	HR	IC95	P-value ajustée	MALE (18)	P-value	HR	IC95	P-value ajustée
Histologie											
Microcalcifications. n (%)	16 (20)	3 (13)	.53	0.50	0.12 ; 2.00	.33	3 (17)	.76	1.20	0.28 ; 5.08	.80
Calcifications fibreuses. n (%)	63 (78)	21 (91)	.13	9.28	1.14 ; 75.2	.04	15 (83)	.69	1.367	0.34 ; 5.49	.67
Nodules. n (%)	66 (81)	18 (78)	.19	0.55	0.17 ; 1.80	.32	12 (67)	.04*	0.13	0.04 ; 0.50	.003*
Métaplasie ostéoïde. n (%)	41 (51)	12 (52)	.86	1.03	0.31 ; 3.36	.96	9 (50)	.74	0.763	0.25 ; 2.26	.62
Formule leucocytaire											
Leucocytes (G/L). moy ± SD	7.2 ± 2.4	7.9 ± 3.3	.10	1.17	0.97 ; 1.41	-	8.2 ± 4	.01*	1.293	1.05 ; 1.59	-
Neutrophiles (G/L). moy ± SD	4.4 ± 2.1	5.1 ± 3	.08	1.19	0.98 ; 1.44	-	5.5 ± 3.7	.0001*	1.60	1.25 ; 2.06	.0003*
Lymphocytes (G/L). moy ± SD	1.9 ± 0.8	2 ± 0.9	.13	1.478	0.89 ; 2.42	-	2 ± 1	.62	1.15	0.67 ; 1.96	-
Monocytes (G/L). moy ± SD	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.3	.06	8.57	0.90 ; 81.6	-	0.7 ± 0.3	.97	1.05	0.08 ; 13.4	-
Immunohistochimie											
CD20 + médiane [quartiles]†	0.7 [0.14 - 2.51]	1.44 [0.19 - 5.74]	.04*	1.08	1.00 ; 1.17	-	1.95 [0.19 - 18.88]	.03*	1.06	1.01 ; 1.13	-
CD68 + médiane [quartiles]†	1.13 [0.36 - 3.49]	1.54 [0.75 - 2.83]	.99	1.00	0.86 ; 1.16	-	1.37 [0.48 - 2.34]	.66	0.59	0.54 ; 1.47	-

Légende : Les valeurs sont affichées en tant que moyenne ± SD ou médiane [quartiles] pour les données continues, les fréquences sont indiquées en nombre de patients (pourcentage). Pour les données histologiques, l'indice de corrélation a été calculé et est présenté sous la forme d'un Hazard Ratio (HR) avec son intervalle de confiance à 95% (IC95). Les p-values ont été obtenus après analyses de Cox univariées et stratifiées sur la cohorte (ECLA et ECLAGEN) et le sexe ; ils sont considérés significatifs lorsque <0,05 (*). Les p-values ajustés proviennent d'une analyse de Cox multivariée avec stratification sur la cohorte. † Analyses conduites sur 38 plaques de la cohorte ECLA.

Abréviations : MACE = *major adverse cardiac events*, incluent la mortalité cardiovasculaire, l'angor instable, l'infarctus du myocarde ou la survenue d'un accident vasculaire cérébral ; MALE = *major adverse limb events* incluent les amputations majeures (au-dessus de la cheville) et les réinterventions majeures sur le membre inférieur index ; SD = écart-type ; G/L = giga par litre.



A.



B.

Figure 7. Infiltration lymphocytaire B et monocyttaire/macrophagique au sein des plaques fémorales. **(A.)** Le marquage CD20+ est caractéristique des lymphocytes B et a été réalisé en immunohistochimie, ayant permis de compter le nombre de cellules marquées par mm² de plaque d'athérome. **(B.)** Le marquage CD68+ est caractéristiques des monocytes et a été réalisé selon la technique du sandwich à la streptavidine, permettant une analyse de l'aire marquée par mm² de plaque. Les résultats sont représentés sous la forme de boîte à moustache pour les sous-groupes de patients affectés par un MACE, un MALE ou un décès. Seule l'infiltration par les CD20+ était significativement associée à la survenue d'un MACE ou d'un MALE (p=0,04 et 0,03 respectivement).

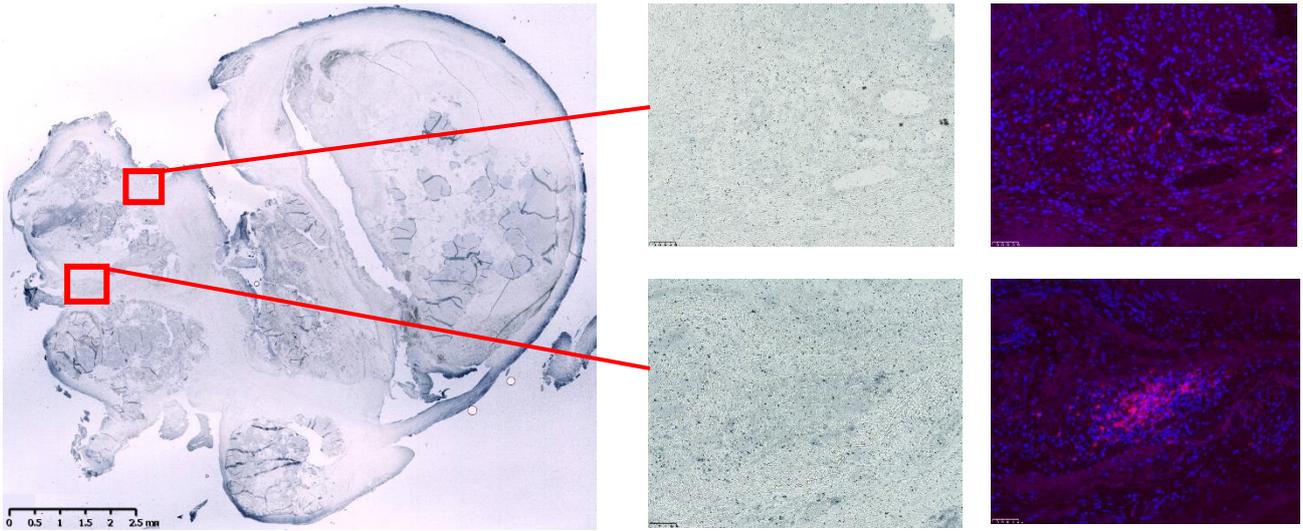


Figure 8. Marquage CD20+ d'une plaque d'athérome fémorale, visible en immunohistochimie.

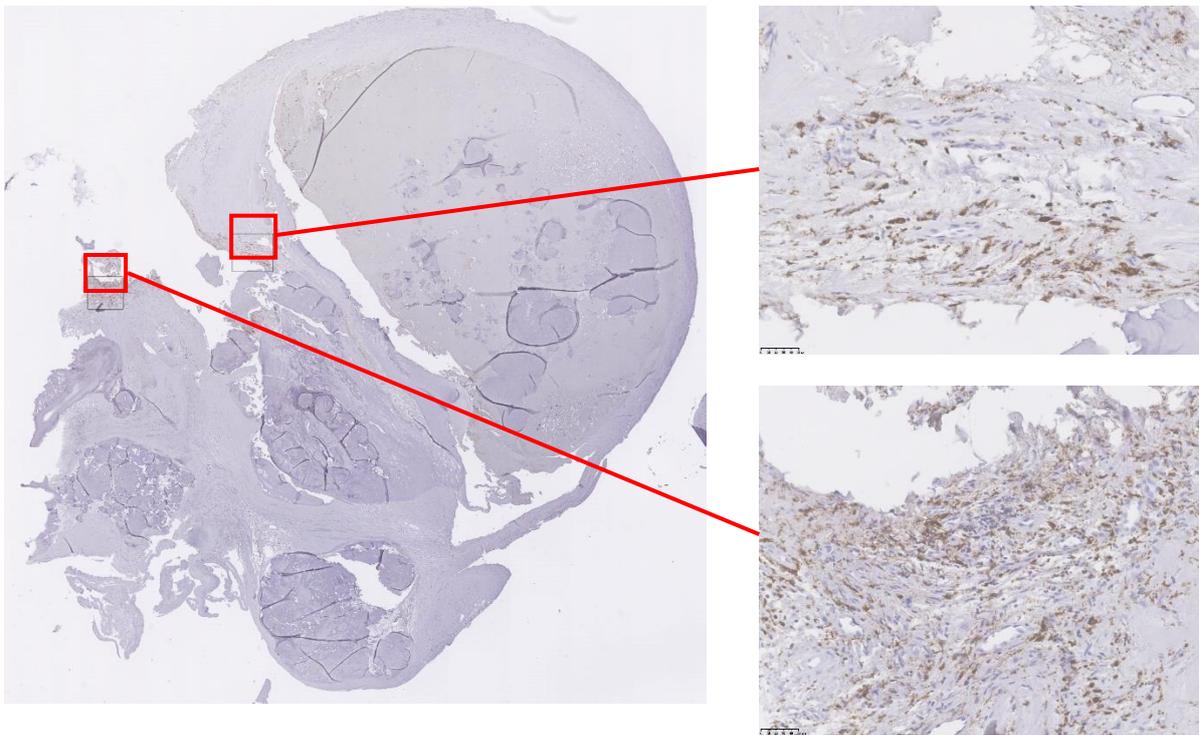


Figure 9. Marquage CD68+ d'une plaque d'athérome fémorale, à la biotine/streptavidine.

DISCUSSION

Les calcifications vasculaires artérielles apparaissent au cours de l'évolution de la plaque d'athérome, et sont reconnues en territoire coronarien comme un facteur prédictif indépendant de morbi-mortalité cardiovasculaire (71). L'établissement de scores calciques semblables adaptés aux territoires périphériques (72) aurait l'avantage de pouvoir prédire les événements cardiovasculaires systémiques mais aussi les événements locaux de morbidité (réintervention, amputation majeure). Cependant, ces scores issus de l'imagerie ne permettent pas d'englober toute l'hétérogénéité des calcifications, constatée aux niveaux histologiques, moléculaires et transcriptomiques dans les différents territoires périphériques concernés (73,74). Cette hétérogénéité moléculaire retrouve son semblable en termes cliniques, puisque l'on regroupe au sein de l'athérosclérose des maladies et des symptômes différents comme l'angine de poitrine et infarctus du myocarde, les accidents ischémiques transitoires et accidents vasculaires cérébraux ou alors la claudication intermittente et l'ischémie critique chronique. A ce jour, aucun des précédents travaux n'a pu établir de score pronostique sensible et spécifique pour déterminer la survenue de complications locales ou systémiques à moyen et long terme pour le territoire carotidien ou fémoral.

Plusieurs études historiques et récentes dressent un état des lieux du devenir à moyen et long terme des patients traités par endartériectomie du trépied fémoral (64–69). Le tableau I récapitule et résume les données statistiques tirées de chaque étude, concernant notamment la survie globale, la survie sans amputation, la survie sans réintervention et les taux de perméabilité primaire brut et assisté.

En résumé, la chirurgie du trépied fémoral est une chirurgie qui se solde par un taux faible de complications majeures en postopératoire immédiat (complications majeures autour de 5%, mortalité intra-hospitalière de 0 à 2%) et dont les résultats de perméabilité à long terme sont bons, avec une survie sans amputation comprise entre 94 et 100% et une survie sans revascularisation secondaire de la lésion index (*target lesion revascularization* : TLR) allant de 68% à 95% à 5 ans. La survie globale à 5 ans de ces patients est comprise entre 60,5 et 89%. Les patients opérés sont majoritairement claudicants (60 à 80%) et tirent un bénéfice notable de la prise en charge avec une amélioration de l'IPS (+0,23 à +0,37) et une amélioration majeure du statut clinique pour près de 60% d'entre eux, selon les études. Nos résultats pour la cohorte ECLA-LT sont proches de ces données puisque la survie globale est de 85,1% à 3 ans ; le taux de perméabilité primaire est de 94% à 1 an et 85% à 3 ans ; la survie sans TLR est de 76% à 3 ans et la survie sans amputation est de 95% à 3 ans.

Définir précisément ces chiffres et notamment les complications liées à ce geste permet de définir et de comparer les critères d'efficacité et de sécurité des nouveaux traitements proposés dans ces indications thérapeutiques. Ainsi, le traitement de ces lésions par stenting de l'artère fémorale commune est en cours d'évaluation (75,76). Sur une étude de cohorte monocentrique, Azéma et al. a montré en 2011 une survie sans TLR de 85% et une survie sans *target extremity revascularization* (TER) de 80% pour un taux de resténose à 20% après stenting de l'artère fémorale commune à 1 an. De façon complémentaire l'étude TECCO (Gouëffic et al. 2017) a comparé les résultats du stenting et de la chirurgie conventionnelle à 2 ans : les résultats sont en faveur d'une diminution significative de la morbi-mortalité péri-

opératoire après stenting, sans différence sur la perméabilité primaire, la survie sans TLR ni sans TER et la mortalité globale.

De façon complémentaire, il est intéressant de connaître précisément les statistiques de ces données afin de définir au mieux des marqueurs pronostiques fiables permettant de mieux suivre les patients au long terme. Kechagias et al. (67) ont retrouvé la CRP comme facteur prédictif indépendant de survie globale, mais ce paramètre n'a pas fait la preuve de sa perspicacité clinique au quotidien, il n'est pas utilisé chez les patients traités pour de l'AOMI (contrairement aux patients souffrant d'angor instable et d'infarctus du myocarde). Notre objectif était de rechercher de nouveaux marqueurs biologiques et/ou histologiques prédictifs de survenue d'événements loco-régionaux ou systémiques. Nos travaux visaient plus précisément à étudier l'impact des calcifications, notamment de la métaplasie ostéoïde, sur le pronostic à moyen et long terme de patients opérés pour une sténose *de novo* du trépiéd fémoral.

En territoire coronarien, les calcifications vasculaires sont aujourd'hui reconnues comme un facteur prédictif indépendant de morbi-mortalité. Les études pour analyses combinées par scanner, échographie intravasculaire et histologie ont permis de définir un score calcique (77) permettant d'apprécier le potentiel évolutif de la pathologie chez le patient et donc d'orienter le choix thérapeutique du praticien. Des analyses similaires sont à l'étude en chirurgie vasculaire, qui va s'intéresser aussi bien au degré de sténose qu'au degré de calcification de la plaque d'athérome (entre autres caractéristiques de la plaque disponibles sur les imageries) pour juger de la stratégie thérapeutique la plus adaptée. Par exemple, il a été défini des critères échographiques d'instabilité de la plaque d'athérome au niveau du territoire carotidien, *a fortiori* dans les contextes évocateurs de sténose carotidienne symptomatique. En plus du critère radiologique de sténose serrée (78) (NASCEt et ECST), ces critères échographiques d'instabilité (échogénicité, échostructure, calcifications, anfractuosités, grey-scale median, etc.) nous permettent de mieux définir les situations éligibles à une prise en charge chirurgicale à visée préventive. Il manque cependant un score calcique validé qui soit prédictif de complications dans les territoires périphériques (membres inférieurs), et qui permettrait d'adapter la stratégie thérapeutique aux caractéristiques propres à chaque patient (recherche translationnelle pour le développement d'une médecine et d'une chirurgie personnalisées).

Les analyses histologiques précédemment réalisées par notre équipe sur les deux biocollections ont permis de rapporter une grande hétérogénéité de la constitution des plaques en fonction des territoires vasculaires concernés. Ainsi, les plaques carotidiennes sont plus lipidiques et présentent des microcalcifications, alors plus promptes à entraîner la rupture de la plaque ; à l'inverse les plaques fémorales sont peu cellularisées, peu inflammatoires, plus fibrosées et avec un fort taux de calcifications semblables à l'ossification, la métaplasie ostéoïde (39,79,80). Il s'agit d'une confirmation microscopique des caractéristiques macroscopiques constatées en per-opératoire par le chirurgien vasculaire. Les plaques d'athéromes carotidiennes sont molles et s'effritent sous les pinces tandis que les plaques fémorales sont très dures, difficiles à manipuler et à coudre dans la paroi. Au-delà de ces constats per-opératoires nécessitant l'adaptation des techniques et des matériaux utilisés (pinces et aiguilles spécifiques pour les parois fémorales très calcifiées ; clampages carotidiens

doux ; développement de filtres pour éviter la migration de micro-débris) il était intéressant de comparer cette hétérogénéité clinique à l'hétérogénéité microscopique territoriale, notamment sur le devenir à moyen et long terme. Nous avons pu démontrer par ce travail que la présence de MO est corrélée à l'âge des patients, mais pas à la survenue d'un MACE ou d'un MALE. Selon notre analyse les différences de calcification au sein de la plaque ne sont pas un critère histologique efficace pour prédire les complications et les événements secondaires chez les patients.

De façon similaire à la constitution de nos biocollections ECLA et ECLAGEN, la biocollecion danoise Athero-Express (81–83,52) a réuni depuis 2002 les plaques d'athérome des patients opérés au niveau de la bifurcation carotidienne et du trépied iliofémoral, de façon consécutive, bicentrique, prospective et longitudinale. Les plaques et les données cliniques ont été analysées régulièrement lors des quinze dernières années et permettent d'apporter des données complémentaires à nos propres données. Ainsi, les analyses histologiques réalisées concernaient l'infiltration des plaques par les macrophages (marquage CD68), les cellules musculaires lisses vasculaires (α -actine), les cellules endothéliales (marquage CD34), mais aussi la présence de collagène de type I, des calcifications par méthode semi quantitative (rouge alizarine et coloration Von Kossa), la présence de thrombus, d'hémorragie intraplaque et de core lipidique. En parallèle, les données cliniques préopératoires et les données postopératoires étaient recueillies prospectivement par le moyen d'un questionnaire adressé aux patients tous les ans pendant 3 ans après l'intervention index, et concernaient la mortalité globale et cardiovasculaire, les AVC, les infarctus du myocarde, les (ré)interventions vasculaires (coronaires et périphériques) et les amputations.

Leurs analyses corroborent nos données. Les plaques fémorales sont fibreuses, riches en collagène et en cellules musculaires lisses mais pauvres en lipides (seulement 25% des plaques). Beaucoup de ces plaques sont calcifiées (69% dans Athero-Express, 94% dans ECLA et ECLAGEN) et peu infiltrées par les cellules inflammatoires (20% de plaques infiltrées pour Athero-Express, 2 à 5% d'infiltration macrophagique dans ECLA-LT). En dix ans, les plaques fémorales se sont stabilisées et sont encore moins riches en lipides. Malgré cela, et malgré la prévention secondaire, les patients atteints d'AOMI continuent à présenter plus d'événements cardiovasculaires secondaires que la population générale. De façon intéressante, la présence de calcifications dans les plaques était inversement corrélée à une resténose locale dans leur biocollecion, tandis que nous n'avons pas pu établir de corrélation dans notre cas. De façon similaire dans notre étude, la présence de calcification n'a pu être corrélée significativement à la survenue d'événements cardiovasculaires secondaires.

En conclusion, la reconnaissance d'un score calcique périphérique profiterait cependant favorablement aux praticiens. Même si les calcifications ne semblent pas conditionner directement pas le devenir cardiovasculaire du patient, elles impactent largement sur les possibilités thérapeutiques à proposer – et en devenir. Dans la réalité quotidienne, avec l'essor des techniques endovasculaires, la caractérisation histologique post-opératoire des plaques d'athérome n'a finalement que peu d'impact clinique et d'application possible. Mais d'autres outils nous permettent d'apprécier les calcifications vasculaires selon des critères complémentaires aux données morphologiques brutes. L'imagerie scanographique et échographique nous fournit des index du degré de calcification et des critères de stabilité ou d'instabilité des plaques, en sus des critères plus connus de localisation, de sténose et de vélocité. A l'avenir, mieux connues des praticiens, ces données pourraient nous permette

d'orienter le choix thérapeutique initial (traitement médical vs traitement chirurgical conventionnel ou endovasculaire) et de renforcer le suivi (local et systémique) et la prévention secondaire chez les patients en fonction des caractéristiques intrinsèques des plaques d'athérome.

En parallèle de l'impact des calcifications vasculaires dans la prise en charge de la pathologie athéromateuse, il est essentiel de s'intéresser à la composante inflammatoire de cette pathologie. Les marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) sont des biomarqueurs de l'évolution de la maladie cardiovasculaire à différents étages (coronaire et périphérique) mais restent d'une portée limitée concernant l'AOMI. Dopheide et al. (84) ont rapporté une augmentation des monocytes circulants CD68+ chez les patients en ischémie critique chronique ; Zimmermann et al. (85) ont montré une augmentation de l'infiltration des plaques fémorales par les cellules CD68+ chez ces mêmes patients. Ces éléments tendent à montrer que l'inflammation systémique est en lien avec la sévérité clinique et l'atteinte multifocale des patients. Dans nos travaux, l'infiltration macrophagique des plaques d'athérome (marquage CD68+) n'était pas corrélée avec les critères MACE ou MALE mais était associée à une augmentation de la mortalité globale ($p < 0,015$). Cependant, on notera que les marquages réalisés dans cette étude étaient peu spécifiques et ne s'attachaient notamment pas à distinguer les différentes sous-populations macrophagiques. Cela constitue une nouvelle piste d'explorations.

Concernant les autres paramètres de l'inflammation, nous avons pu associer l'augmentation des polynucléaires neutrophiles circulants avec la survenue d'événements loco-régionaux secondaires, tout comme nous avons pu associer l'infiltration en lymphocytes B (marquage CD20+) et la survenue de MACE et/ou MALE.

Les lymphocytes B ont un rôle pour l'instant mineur dans le processus physiopathologique de l'athérosclérose. C'est en nous appuyant sur des données tirées de puces transcriptomiques réalisées sur nos cohortes que nous avons cherché à approfondir le rôle de ces lymphocytes au sein de la plaque d'athérome. En effet les données préopératoires accessibles pour nos patients (numération-formule sanguine) ne nous permettaient pas de distinguer les différentes populations lymphocytaires en systémique. Le rôle précis de cette population lymphocytaire est également à creuser chez l'homme. Plusieurs études sur des modèles murins ont pu montrer l'impact des lymphocytes B dans le développement et la stabilisation de la plaque d'athérome.

Dans le modèle actuel de la médecine et de la chirurgie personnalisée et du développement des thérapies ciblées, l'étude de l'hétérogénéité moléculaire et épigénétique des plaques artérielles ouvre sur des pistes thérapeutiques ciblées tangibles. Même si l'on n'a pas pu démontrer ici l'impact direct de l'ossification sur le devenir clinique des patients, l'étude des processus physiopathologiques sous-tendant son apparition pourrait amener à proposer des thérapies innovantes. On pense notamment aux ballons et stents actifs, qui pourraient délivrer non plus des molécules antiprolifératives comme le Paclitaxel ou le Sirolimus mais aussi des molécules anti-minéralisantes, dans l'objectif de stabiliser la plaque et de limiter alors le risque de rupture locale, ou des molécules anti-inflammatoires visant à limiter l'extension de la maladie athéromateuse.

Notre étude possède plusieurs limites. La conception monocentrique et rétrospective limite la puissance statistique des données disponibles, tout comme le nombre de patients inclus. Malgré cela, la compliance de nos patients vis-à-vis de leur suivi nous a permis de récolter suffisamment de données analysables jusqu'à 5 ans après leur intervention.

Les données histologiques constituent une autre faiblesse de l'étude, car trop de peu d'échantillons ne présentaient pas de calcification, empêchant les comparaisons avec un groupe contrôle négatif. La puissance statistique des résultats était aussi limitée par l'intrication des différents types de calcifications au sein d'une même plaque, ayant motivé le recours à des calculs complexes en concaténer.

CONCLUSION

La population ECLA-LT est constituée d'un groupe de patients traités chirurgicalement pour une lésion de novo de l'artère fémorale commune dont la plaque d'athérome a été histologiquement analysée. Cette population de 81 patients (86 échantillons) est comparable aux données cliniques et histologiques de la littérature en termes de devenir et de complications à court, moyen et long terme, également en termes histologiques. La présence de métaplasie ostéoïde (ossification) au sein des plaques n'a pas été corrélée à la survenue d'événements majeurs cardiovasculaires systémiques ou locaux. En revanche, l'infiltration des plaques par des lymphocytes B et une hyperneutrophilie sur la NFS étaient significativement associés à une majoration du risque d'événement cardiovasculaire secondaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. WHO. World Health Statistics 2014. [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2014 [cité 10 août 2017]. 180 p. Disponible sur: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=1741840>
2. Fowkes FGR, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *The Lancet*. 2013;382(9901):1329–1340.
3. Knowles JW, Assimes TL, Li J, Quertermous T, Cooke JP. Genetic susceptibility to peripheral arterial disease: a dark corner in vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(10):2068–2078.
4. Conte MS, Pomposelli FB, Clair DG, Geraghty PJ, McKinsey JF, Mills JL, et al. Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: Management of asymptomatic disease and claudication. *J Vasc Surg*. mars 2015;61(3):2S-41S.e1.
5. Libby P. Inflammation in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1 sept 2012;32(9):2045-51.
6. Libby P, Bornfeldt KE, Tall AR. Atherosclerosis Compendium. *Circ Res* [Internet]. 19 févr 2016;118(4). Disponible sur: <http://circres.ahajournals.org.gate2.inist.fr/content/118/4>
7. Chen Q, Bei J-J, Liu C, Feng S-B, Zhao W-B, Zhou Z, et al. HMGB1 Induces Secretion of Matrix Vesicles by Macrophages to Enhance Ectopic Mineralization. Zhang C, éditeur. *PLOS ONE*. 31 mai 2016;11(5):e0156686.
8. New SEP, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, et al. Macrophage-Derived Matrix Vesicles: An Alternative Novel Mechanism for Microcalcification in Atherosclerotic Plaques. *Circ Res*. 21 juin 2013;113(1):72-7.
9. Lee B, Iwaniec UT, Turner RT, Lin Y-W, Clarke BL, Gingery A, et al. RIP140 in monocytes/macrophages regulates osteoclast differentiation and bone homeostasis. *JCI Insight* [Internet]. 6 avr 2017 [cité 27 mars 2018];2(7). Disponible sur: <https://insight.jci.org/articles/view/90517>
10. Scholtes VPW, Johnson JL, Jenkins N, Sala-Newby GB, de Vries J-PPM, de Borst GJ, et al. Carotid atherosclerotic plaque matrix metalloproteinase-12-positive macrophage subpopulation predicts adverse outcome after endarterectomy. *J Am Heart Assoc*. déc 2012;1(6):e001040.
11. Randolph GJ. Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. *Circ Res*. 23 mai 2014;114(11):1757-71.

12. Cho KY, Miyoshi H, Kuroda S, Yasuda H, Kamiyama K, Nakagawara J, et al. The Phenotype of Infiltrating Macrophages Influences Arteriosclerotic Plaque Vulnerability in the Carotid Artery. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* oct 2013;22(7):910-8.
13. Shaikh S, Brittenden J, Lahiri R, Brown PAJ, Thies F, Wilson HM. Macrophage Subtypes in Symptomatic Carotid Artery and Femoral Artery Plaques. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* nov 2012;44(5):491-7.
14. Wigren M, Nilsson J, Kolbus D. Lymphocytes in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* oct 2012;413(19-20):1562-8.
15. Quillard T, Araújo HA, Franck G, Shvartz E, Sukhova G, Libby P. TLR2 and neutrophils potentiate endothelial stress, apoptosis and detachment: implications for superficial erosion. *Eur Heart J.* 7 juin 2015;36(22):1394-404.
16. Kyaw T, Tipping P, Bobik A, Toh B-H. Protective Role of Natural IgM-Producing B1a Cells in Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* févr 2012;22(2):48-53.
17. Taleb S. Inflammation in atherosclerosis. *Arch Cardiovasc Dis.* déc 2016;109(12):708-15.
18. Zougari Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guérin C, et al. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med.* oct 2013;19(10):1273-80.
19. Mantani PT, Ljungcrantz I, Andersson L, Alm R, Hedblad B, Björkbacka H, et al. Circulating CD40⁺ and CD86⁺ B Cell Subsets Demonstrate Opposing Associations With Risk of Stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* janv 2014;34(1):211-8.
20. Ammirati E, Moroni F, Magnoni M, Camici PG. The role of T and B cells in human atherosclerosis and atherothrombosis: Role of B and T cells in human atherosclerosis. *Clin Exp Immunol.* févr 2015;179(2):173-87.
21. Yan W, Song H, Jiang J, Xu W, Gong Z, Duan Q, et al. Characteristics of B cell-associated gene expression in patients with coronary artery disease. *Mol Med Rep.* mai 2016;13(5):4113-21.
22. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 21 sept 2017;377(12):1119-31.
23. Herisson F, Heymann M-F, Chétiveaux M, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, et al. Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. *Atherosclerosis.* juin 2011;216(2):348-54.
24. Greenland P, Bonow RO, Brundage BH, Budoff MJ, Eisenberg MJ, Grundy SM, et al. ACCF/AHA 2007 Clinical Expert Consensus Document on Coronary Artery Calcium Scoring By Computed Tomography in Global Cardiovascular Risk Assessment and in Evaluation of Patients With Chest Pain: A Report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000

- Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography) Developed in Collaboration With the Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention and the Society of Cardiovascular Computed Tomography. *J Am Coll Cardiol*. 23 janv 2007;49(3):378-402.
25. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. mai 2000;20(5):1177-8.
 26. Maldonado N, Kelly-Arnold A, Vengrenyuk Y, Laudier D, Fallon JT, Virmani R, et al. A mechanistic analysis of the role of microcalcifications in atherosclerotic plaque stability: potential implications for plaque rupture. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. sept 2012;303(5):H619-28.
 27. Wong KK, Thavornpattanapong P, Cheung SC, Sun Z, Tu J. Effect of calcification on the mechanical stability of plaque based on a three-dimensional carotid bifurcation model. *BMC Cardiovasc Disord* [Internet]. déc 2012 [cité 15 mars 2018];12(1). Disponible sur: <http://bmccardiovascdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2261-12-7>
 28. Libby P, Pasterkamp G. Requiem for the « vulnerable plaque ». *Eur Heart J*. 14 nov 2015;36(43):2984-7.
 29. Criqui MH, Denenberg JO, Ix JH, McClelland RL, Wassel CL, Rifkin DE, et al. Calcium Density of Coronary Artery Plaque and Risk of Incident Cardiovascular Events. *JAMA*. 15 janv 2014;311(3):271.
 30. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15(4):827–832.
 31. Rennenberg RJMW, Kessels AGH, Schurgers LJ, van Engelshoven JMA, de Leeuw PW, Kroon AA. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5(1):185-97.
 32. Allison MA, Hsi S, Wassel CL, Morgan C, Ix JH, Wright CM, et al. Calcified Atherosclerosis in Different Vascular Beds and the Risk of Mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 14 déc 2011;32(1):140.
 33. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo J-L, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation*. 11 déc 2007;116(24):2841-50.
 34. Hutcheson JD, Goettsch C, Bertazzo S, Maldonado N, Ruiz JL, Goh W, et al. Genesis and growth of extracellular-vesicle-derived microcalcification in atherosclerotic plaques. *Nat Mater*. 11 janv 2016;15(3):335-43.
 35. Chatrou MLL, Cleutjens JP, van der Vusse GJ, Roijers RB, Mutsaers PHA, Schurgers LJ. Intra-Section Analysis of Human Coronary Arteries Reveals a Potential Role for Micro-Calcifications in Macrophage Recruitment in the Early Stage of Atherosclerosis. Gadeau A-P, éditeur. *PLOS ONE*. 10 nov 2015;10(11):e0142335.

36. Albarrán-Juárez J, Kaur H, Grimm M, Offermanns S, Wettschureck N. Lineage tracing of cells involved in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. août 2016;251:445-53.
37. Qiao J-H, Mertens RB, Fishbein MC, Geller SA. Cartilaginous metaplasia in calcified diabetic peripheral vascular disease: Morphologic evidence of enchondral ossification. *Hum Pathol*. avr 2003;34(4):402-7.
38. Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, López-Ongil S, et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res*. 8 mai 2009;104(9):1041-8.
39. Davaine J-M, Quillard T, Brion R, Lapérine O, Guyomarch B, Merlini T, et al. Osteoprotegerin, Pericytes and Bone-Like Vascular Calcification Are Associated with Carotid Plaque Stability. Aikawa E, éditeur. *PLoS ONE*. 26 sept 2014;9(9):e107642.
40. Dalager S, Paaske WP, Bayer Kristensen I, Marsvin Laurberg J, Falk E. Artery-Related Differences in Atherosclerosis Expression: Implications for Atherogenesis and Dynamics in Intima-Media Thickness. *Stroke*. 1 oct 2007;38(10):2698-705.
41. Haimovici H, Maier N. FATE OF AORTIC HOMOGRAFTS IN CANINE ATHEROSCLEROSIS. 3. STUDY OF FRESH ABDOMINAL AND THORACIC AORTIC IMPLANTS INTO THORACIC AORTA: ROLE OF TISSUE SUSCEPTIBILITY IN ATHEROGENESIS. *Arch Surg Chic Ill* 1960. déc 1964;89:961-9.
42. Leroux-Berger M, Queguiner I, Maciel TT, Ho A, Relaix F, Kempf H. Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal embryonic origin. *J Bone Miner Res*. juill 2011;26(7):1543-53.
43. Majesky MW. Developmental Basis of Vascular Smooth Muscle Diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23 mai 2007;27(6):1248.
44. Thondapu V, Bourantas CV, Foin N, Jang I-K, Serruys PW, Barlis P. Biomechanical stress in coronary atherosclerosis: emerging insights from computational modelling. *Eur Heart J*. 22 févr 2016;ehv689.
45. Gouëffic Y, Davaine J-M, Merlini T, Rimbart A, Hérisson F, Heymann M-F, et al. Artériopathie et hétérogénéité artérielle. *Rev Médecine Interne*. janv 2013;34(1):61-5.
46. Heymann M-F, Herisson F, Davaine J-M, Charrier C, Battaglia S, Passuti N, et al. Role of the OPG/RANK/RANKL triad in calcifications of the atheromatous plaques: Comparison between carotid and femoral beds. *Cytokine*. mai 2012;58(2):300-6.
47. Davaine J-M, Quillard T, Chatelais M, Guilbaud F, Brion R, Guyomarch B, et al. Bone Like Arterial Calcification in Femoral Atherosclerotic Lesions: Prevalence and Role of Osteoprotegerin and Pericytes. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. févr 2016;51(2):259-67.
48. Steenman M, Espitia O, Maurel B, Guyomarch B, Heymann M-F, Pistorius M-A, et al. Identification of genomic differences among peripheral arterial beds in atherosclerotic and healthy arteries. *Sci Rep*. 2 mars 2018;8(1):3940.

49. Derksen WJM, de Vries J-PPM, Vink A, Velema E, Vos J-A, de Kleijn D, et al. Histologic atherosclerotic plaque characteristics are associated with restenosis rates after endarterectomy of the common and superficial femoral arteries. *J Vasc Surg.* sept 2010;52(3):592-9.
50. Zimmermann A, Senner S, Eckstein H-H, Pelisek J. Histomorphological evaluation of atherosclerotic lesions in patients with peripheral artery occlusive disease. *Adv Med Sci.* sept 2015;60(2):236-9.
51. Haitjema S, van Haelst STW, de Vries J-PPM, Moll FL, den Ruijter HM, de Borst GJ, et al. Time-dependent differences in femoral artery plaque characteristics of peripheral arterial disease patients. *Atherosclerosis.* déc 2016;255:66-72.
52. van Haelst STW, Haitjema S, Derksen W, van Koeverden I, de Vries J-PPM, Moll FL, et al. Atherosclerotic plaque characteristics are not associated with future cardiovascular events in patients undergoing iliofemoral endarterectomy. *J Vasc Surg.* mars 2018;67(3):809-816.e1.
53. Mukherjee D, Inahara T. Endarterectomy as the procedure of choice for atherosclerotic occlusive lesions of the common femoral artery. *Am J Surg.* mai 1989;157(5):498-500.
54. Springhorn ME, Kinney M, Littooy FN, Saletta C, Greisler HP. Inflow atherosclerotic disease localized to the common femoral artery: Treatment and outcome. *Ann Vasc Surg.* 1991;5(3):234-40.
55. Cardon A, Aillet S, Jarno P, Bensalah K, Le Du J, Idrissi A, et al. [Endarterectomy of the femoral tripod: long-term results and analysis of failure factors]. *Ann Chir.* oct 2001;126(8):777-82.
56. Kechagias A, Ylönen K, Biancari F. Long-term Outcome after Isolated Endarterectomy of the Femoral Bifurcation. *World J Surg.* 2008;32(1):51-4.
57. Kang JL, Patel VI, Conrad MF, LaMuraglia GM, Chung TK, Cambria RP. Common femoral artery occlusive disease: Contemporary results following surgical endarterectomy. *J Vasc Surg.* oct 2008;48(4):872-877.e1.
58. Ballotta E, Gruppo M, Mazzalai F, Da Giau G. Common femoral artery endarterectomy for occlusive disease: An 8-year single-center prospective study. *Surgery.* févr 2010;147(2):268-74.
59. Krishna S, Moxon J, Golledge J. A Review of the Pathophysiology and Potential Biomarkers for Peripheral Artery Disease. *Int J Mol Sci.* 18 mai 2015;16(5):11294-322.
60. Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, Johnston KW, Porter JM, Ahn S, et al. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. *J Vasc Surg.* sept 1997;26(3):517-38.

61. Espitia O, Chatelais M, Steenman M, Charrier C, Maurel B, Georges S, et al. Implication of molecular vascular smooth muscle cell heterogeneity among arterial beds in arterial calcification. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191976.
62. Conte MS, Geraghty PJ, Bradbury AW, Hevelone ND, Lipsitz SR, Moneta GL, et al. Suggested objective performance goals and clinical trial design for evaluating catheter-based treatment of critical limb ischemia. *J Vasc Surg*. déc 2009;50(6):1462-1473.e3.
63. Pentecost MJ, Criqui MH, Dorros G, Goldstone J, Johnston KW, Martin EC, et al. Guidelines for peripheral percutaneous transluminal angioplasty of the abdominal aorta and lower extremity vessels. A statement for health professionals from a special writing group of the Councils on Cardiovascular Radiology, Arteriosclerosis, Cardio-Thoracic and Vascular Surgery, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention, the American Heart Association. *Circulation*. 1994;89(1):511-531.
64. Mukherjee D, Inahara T. Endarterectomy as the procedure of choice for atherosclerotic occlusive lesions of the common femoral artery. *Am J Surg*. mai 1989;157(5):498-500.
65. Springhorn ME, Kinney M, Littooy FN, Saletta C, Greisler HP. Inflow atherosclerotic disease localized to the common femoral artery: Treatment and outcome. *Ann Vasc Surg*. 1991;5(3):234-40.
66. Cardon A, Aillet S, Jarno P, Bensalah K, Le Du J, Idrissi A, et al. [Endarterectomy of the femoral tripod: long-term results and analysis of failure factors]. *Ann Chir*. oct 2001;126(8):777-82.
67. Kechagias A, Ylönen K, Biancari F. Long-term Outcome after Isolated Endarterectomy of the Femoral Bifurcation. *World J Surg*. 2008;32(1):51-4.
68. Kang JL, Patel VI, Conrad MF, LaMuraglia GM, Chung TK, Cambria RP. Common femoral artery occlusive disease: Contemporary results following surgical endarterectomy. *J Vasc Surg*. oct 2008;48(4):872-877.e1.
69. Ballotta E, Gruppo M, Mazzalai F, Da Giau G. Common femoral artery endarterectomy for occlusive disease: An 8-year single-center prospective study. *Surgery*. févr 2010;147(2):268-74.
70. Vrijenhoek JEP, Haitjema S, de Borst GJ, de Vries J-PPM, Vaartjes I, Moll FL, et al. The impact of female sex on long-term survival of patients with severe atherosclerosis undergoing endarterectomy. *Atherosclerosis*. déc 2014;237(2):521-7.
71. Greenland P, Bonow RO, Brundage BH, Budoff MJ, Eisenberg MJ, Grundy SM, et al. ACCF/AHA 2007 Clinical Expert Consensus Document on Coronary Artery Calcium Scoring By Computed Tomography in Global Cardiovascular Risk Assessment and in Evaluation of Patients With Chest Pain: A Report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography) Developed in Collaboration With the Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention and the

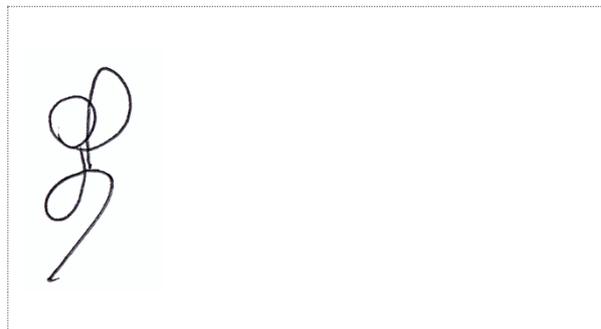
- Society of Cardiovascular Computed Tomography. *J Am Coll Cardiol*. 23 janv 2007;49(3):378-402.
72. Allison MA, Hsi S, Wassel CL, Morgan C, Ix JH, Wright CM, et al. Calcified Atherosclerosis in Different Vascular Beds and the Risk of Mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 14 déc 2011;32(1):140.
 73. Steenman M, Espitia O, Maurel B, Guyomarch B, Heymann M-F, Pistorius M-A, et al. Identification of genomic differences among peripheral arterial beds in atherosclerotic and healthy arteries. *Sci Rep*. 2 mars 2018;8(1):3940.
 74. Espitia O, Chatelais M, Steenman M, Charrier C, Maurel B, Georges S, et al. Implication of molecular vascular smooth muscle cell heterogeneity among arterial beds in arterial calcification. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191976.
 75. Azéma L, Davaine JM, Guyomarch B, Chaillou P, Costargent A, Patra P, et al. Endovascular Repair of Common Femoral Artery and Concomitant Arterial Lesions. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. juin 2011;41(6):787-93.
 76. Gouëffic Y, Della Schiava N, Thaveau F, Rosset E, Favre J-P, Salomon du Mont L, et al. Stenting or Surgery for De Novo Common Femoral Artery Stenosis. *JACC Cardiovasc Interv*. juill 2017;10(13):1344-54.
 77. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15(4):827-832.
 78. Grant EG, Benson CB, Moneta GL, Alexandrov AV, Baker JD, Bluth EI, et al. Carotid artery stenosis: gray-scale and Doppler US diagnosis--Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference. *Radiology*. nov 2003;229(2):340-6.
 79. Herisson F, Heymann M-F, Chétiveaux M, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, et al. Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. *Atherosclerosis*. juin 2011;216(2):348-54.
 80. Davaine J-M, Quillard T, Chatelais M, Guilbaud F, Brion R, Guyomarch B, et al. Bone Like Arterial Calcification in Femoral Atherosclerotic Lesions: Prevalence and Role of Osteoprotegerin and Pericytes. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. févr 2016;51(2):259-67.
 81. Derksen WJM, de Vries J-PPM, Vink A, Velema E, Vos J-A, de Kleijn D, et al. Histologic atherosclerotic plaque characteristics are associated with restenosis rates after endarterectomy of the common and superficial femoral arteries. *J Vasc Surg*. sept 2010;52(3):592-9.
 82. van Lammeren GW, den Ruijter HM, Vrijenhoek JEP, van der Laan SW, Velema E, de Vries J-PPM, et al. Time-Dependent Changes in Atherosclerotic Plaque Composition in Patients Undergoing Carotid Surgery. *Circulation*. 3 juin 2014;129(22):2269-76.

83. Haitjema S, van Haelst STW, de Vries J-PPM, Moll FL, den Ruijter HM, de Borst GJ, et al. Time-dependent differences in femoral artery plaque characteristics of peripheral arterial disease patients. *Atherosclerosis*. déc 2016;255:66-72.
84. Dopheide JF, Rubrech J, Trumpp A, Geissler P, Zeller GC, Bock K, et al. Leukocyte-platelet aggregates-a phenotypic characterization of different stages of peripheral arterial disease. *Platelets*. nov 2016;27(7):658-67.
85. Zimmermann A, Senner S, Eckstein H-H, Pelisek J. Histomorphological evaluation of atherosclerotic lesions in patients with peripheral artery occlusive disease. *Adv Med Sci*. sept 2015;60(2):236-9.

ANNEXE

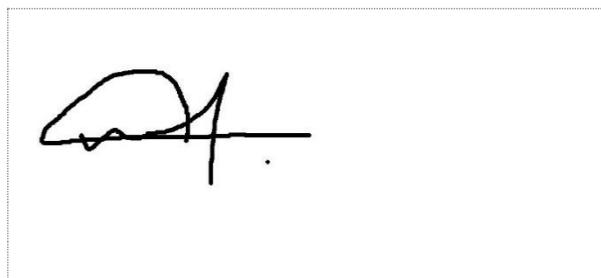
Article soumis le 08/08/2018, publié le 11/06/2019.

Vu, le Président du Jury,



Pr Yann GOUËFFIC

Vu, le Directeur de Thèse,



Dr Blandine MAUREL

Vu, le Doyen de la Faculté,



Professeur Pascale JOLLIET



Clinical Research

Impact of Femoral Ossification on Local and Systemic Cardiovascular Patients' Condition

Aurore Danvin,¹ Thibaut Quillard,² Olivier Espitia,^{2,3,4} Céline Charrier,² Béatrice Guyomarch,⁵ Yann Gouëffic,^{1,2,4} and Blandine Maurel,^{1,2} Nantes, France

Background: Vascular calcifications are associated with a high cardiovascular morbi-mortality in the coronary territory. In parallel, femoral arteries are more calcified and develop osteoid metaplasia (OM). This study was conducted to assess the predictive value of OM and local inflammation on the occurrence of mid- and long-term adverse cardiovascular events.

Method: Between 2008 and 2015, 86 atheromatous samples were harvested during femoral endarterectomy on 81 patients and processed for histomorphological analyses of calcifications and inflammation (monocytes and B cells). Histological findings were compared with the long-term follow-up of patients, including major adverse cardiac event (MACE), major adverse limb event (MALE), and mortality. Frequencies were presented as percentage, and continuous data, as mean and standard deviation. A P -value < 0.05 was considered statistically significant.

Results: Median follow-up was 42.4 months (26.9–58.8). Twenty-eight percent of patients underwent a MACE; a MALE occurred in 18 (21%) limbs. Survival rate was 87.2% at 36 months. OM was found in 41 samples (51%), without any significant impact on the occurrence of MACE, MALE, or mortality. Preoperative white blood cell formulae revealed a higher rate of neutrophils associated with MACE ($P = 0.04$) and MALE ($P = 0.0008$), correlated with higher B cells counts in plaque samples.

Conclusions: OM is part of femoral calcifications in almost 50% of the cases but does not seem to be an independent predictive variable for MACE or MALE. However, a higher rate of B cell infiltration of the plaque and preoperative neutrophil blood count may be predictive of adverse events during follow-up.

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are the leading cause of mortality worldwide, with a physiopathology relying mainly on atherosclerosis.¹ Coronary artery disease is extensively explored, but less is known about peripheral artery disease, despite affecting more than 200 million people worldwide in 2010 with severe morbidity and death.^{2,3} Previous studies have reported a large heterogeneity of atheroma

characteristics depending on its arterial bed location, especially regarding its histomorphological composition in lipids, intraplaque hemorrhage, inflammatory cells, and calcifications, implying that findings from the coronary artery are not necessarily applicable to peripheral territories.^{4–8}

Arterial calcifications in any arterial bed have an impact on plaque stability and complications and are associated with a 3- to 4-fold higher risk for

¹CHU Nantes, l'institut du thorax, service de chirurgie vasculaire, Nantes, France.

²Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse, Inserm UMR S 1238, Nantes, France.

³CHU Nantes, unité de médecine vasculaire, Nantes, France.

⁴Université de Nantes, Nantes, France.

⁵CHU Nantes, institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France.

Correspondence to: Blandine Maurel, CHU Nantes, l'institut du thorax, service de chirurgie vasculaire, Nantes, F-44093, France; E-mail: blandine.maurel@chu-nantes.fr

Ann Vasc Surg 2019; ■: 1–11

<https://doi.org/10.1016/j.avsg.2019.03.035>

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Manuscript received: August 8, 2018; manuscript accepted: March 1, 2019; published online: ■ ■ ■

mortality and cardiovascular events.⁷ In coronary territory, the calcium score is a well-recognized independent predictive factor for cardiovascular events and death.^{9–12} In the carotid territory, lipid-rich and less calcified atheroma is associated with plaque instability and cerebrovascular events.^{6,13,14} In the iliofemoral territory, histologic plaque characteristics, including global calcifications, were not associated with secondary cardiovascular events during follow-up.¹⁵ However, the predictive value of bone-like arterial calcifications (osteoid metaplasia [OM]), preferentially found in the common femoral artery, has not been reported.

A direct role of calcifications is still discussed, while their overall presence unarguably associates with increased cardiovascular events. Previous studies have shown that small calcifications near the lumen increase the chance of physical rupture of the fibrous cap because of aggravated tensile strength at the interface between soft tissues (extracellular matrix, lipid) and hard material (calcifications).^{16,17} Since the beginning of the statin era, clinical data indicate that plaque erosion occurs in a significant and growing number of cases.¹⁸ This type of plaque complications usually intervenes in plaque with abundant fibrosis and smooth muscle cells, similar to the so-called “stable lesion”. Presence and activation of TLR2 signaling and neutrophils seem to actively participate in the development of these types of events.¹⁹ In such lesions, extensive calcifications in contact with the lumen could also trigger the formation of occluding thrombi.²⁰ However, macrocalcifications, notably OM that develop deeper in the lesion, often near the media-intima interface, could stabilize the lesion, at least in the carotid arteries.¹³

As advanced plaques almost consistently present both micro and macro, the overall direct effect on plaque complications can be challenging, and most studies often analyze calcifications without characterizing their distinct phenotypes. We chose to investigate this point with the present study.

In addition to arterial calcifications, atherosclerosis is commonly associated with persistent inflammation. Roles of innate and humoral immunity in the development and evolution or stabilization of atheromatous plaques are well described and are presented as promising therapeutic targets.^{21,22} Inflammatory cells are also closely related to plaque calcifications. Monocytes are precursors of osteoclasts, and plaque monocytes can exhibit osteoclast-like phenotypes with impaired bone resorption activity.²³ Macrophage subsets could also indirectly participate in plaque and calcification

heterogeneity among vascular beds, as M1 and M2 macrophages are characteristic of carotid and femoral lesions, respectively.²⁴ Moreover, inflammation can also derive from infiltrating T and B cells, and secretion of inflammatory cytokines can participate in tissue mineralization.²⁵

Inflammatory cell burden differs significantly within arterial beds (e.g., carotid and femoral plaques), but its specific impact on the occurrence of adverse local and global cardiovascular events has not been clearly elucidated.^{15,26–28}

It would be clinically beneficial if patients at higher risk for secondary cardiovascular adverse events could be identified after a common femoral endarterectomy by a histological analysis of calcification type and inflammation burden of their atheromatous sample. The aim of this study was to assess whether femoral OM was predictive of the severity of both cardiovascular systemic disease and local peripheral arterial disease during long-term follow-up after common femoral endarterectomy. Secondary objectives included the assessment of other types of vascular calcifications (VCs) and of the immunohistochemical (inflammation) composition of the femoral plaque.

METHODS

This study consisted of monocentric matching cohorts, with retrospective longitudinal analysis of prospective data, and has been approved by the local ethics committee (research protocol #PFS09–014, authorized on December 23, 2009, by the Agence de Biomédecine; French Research Ministry, n° DC-2008–402; CNIL, n° 1520735 v 0). It was designed for patients from the “Etude Comparative des Lésions Athéromateuses” (ECLA) and the “Etude Comparative des Lésions Athéromateuses et Génétique” (ECLAGEN) cohorts (see the following section) who underwent surgical common femoral endarterectomy before a bypass or patch closure, to gather long-term clinical data. Before the beginning of this study, every patient was contacted by phone and mail to get an informed consent. When the patients were not reachable by either phone or mail or when their personal doctor had lost contact, they were considered lost and not possible to follow up. The last ultrasound date would then be considered as the date of latest news.

Patients and Biological Samples

ECLA and ECLAGEN cohorts. Recruitment and analysis conducted on the ECLA cohort (between 2008 and 2010) and the ECLAGEN cohort (between

2011 and 2015) have been described previously.⁶ Consecutive patients who underwent femoral endarterectomy were included. Atheromatous plaques and blood samples were collected for histopathological analysis and biological analysis, respectively. Healthy samples for femoral artery were collected from deceased nonatheromatous organ donors.

Inclusion criteria for ECLA and ECLAGEN cohorts were adults (aged over 18 years and under 90 years) and open surgical treatment needed for *de novo* atheromatous lesions. Criteria of exclusion were pregnant women, restenosis, nonatheromatous lesions (dysplasia, posttraumatic, inflammatory), and thrombosis. Blood collection was performed after fasting, on the day of the surgery. Plasma were shortly obtained after centrifugation and stored at -80°C .

Clinical data collection. Patients' perioperative characteristics data were collected from the original database. Follow-up assessment was performed retrospectively using patients' files and information from the general practitioner. Items collected were global mortality, cardiovascular mortality, cerebrovascular event, myocardial infarction, unstable angina, major above-ankle amputation and major reintervention, ankle-brachial index (ABI), and preoperative white blood cell formulae.

Histological and Immunological Analysis

Original human biological samples collection and processing. The process for histological analysis of the endarterectomy samples has been previously described.^{6,29} Briefly, in ECLA and ECLAGEN studies, tunica adventitia was removed, and samples were immediately fixed in formalin for paraffin embedding and histology. After removal of the tunica adventitia, plaques or arterial sections were cut longitudinally in four samples and conditioned as follows: (1) fixation in formalin for paraffin embedding and histology, (2) fixation in paraformaldehyde for OCT[®] embedding and histology, (3) storage in RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Hilden, Germany) and mRNA extraction, (4) snap freezing and storage at -80°C .

Histological analysis. Ten serial sections (3 μm) from the middle of the atherosclerotic lesion were processed. These sections were stained with hematoxylin, eosin, and Masson's trichrome for plaque phenotype analysis and calcification characterization (sheet-like calcifications, nodules, clear center/microcalcifications, and/or OM). Calcifications subtypes were scored binary (yes/no). Microcalcifications were defined as small speckled calcified

particles ($<40\ \mu\text{m}$) usually found within the lipid-rich core of the lesion.³⁰

Immunological analysis. Macrophages and B lymphocytes were stained with CD68 antibody (M0876; Dako[®], Glostrup, Denmark) and CD20 antibody (ab9475; Abcam[®], Cambridge, UK), respectively, and image acquisition was performed using the NanoZoomer digital slide scanner (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Fluorescent staining allowed to manually quantify the number of CD20+ cells, and Image-Pro Plus[®] 6.0 (Media Cybernetics Inc, Rockville, MD) was used to calculate the positive area for CD68 staining. Results were expressed as number of cells (CD20+) or as a percentage of the stained area (CD68+) over the area of the plaque (intima) for each slide.

Primary and Secondary Endpoints

Major adverse limb event (MALE) criteria for patients presenting plaque composition with OM were the primary composite endpoint of the study. MALE is defined by major above-ankle amputation and/or major reintervention on the index limb, including new bypass graft, interposition graft revision, or thrombectomy/thrombolysis.³¹ Secondary endpoints of the study were the assessments of the following event(s) among patients presenting OM in the histological composition of their plaque. Major adverse cardiac events (MACEs) comprised any cardiovascular mortality, cerebrovascular disease, myocardial infarction, and/or unstable angina events. Other secondary endpoints understood global mortality, last follow-up Rutherford classification, and the assessment of the inflammatory burden (CD68+ and CD20+ infiltration) among patients presenting a MACE and/or MALE. Rutherford classification and ABI were collected to evaluate the clinical status improvement at different times during follow-up.^{32,33}

Statistical Analysis

Continuous data were presented as mean \pm standard deviation or median [quartiles] based on the distribution. Demographic and comorbidity data were recorded per patient. The χ^2 or Fisher's exact test (based on expected frequency) was used to compare categorical variables between groups. Categorical variables were presented as counts (proportions). The *t*-test was performed to test for statistical differences in continuous parameters between two groups.

Survival rate curves for outcomes (MALE, MACE, global mortality) were plotted and calculated using the Kaplan-Meier method. Cox

proportional-hazards regression analysis with stratification on cohort [with Hazard Ratios (HRs) and confidence intervals (CIs)] was used to evaluate the independent risk of clinical factors and of blood cell count for MALE, MACE, or death. From univariate analysis, we selected variables with P value <0.25 (statistical criterion) and looked at multicollinearity between variables. For the multivariate models, we kept significant variables. Variables were eliminated from the highest to lowest P values but remained in the final model if the P value was less than 0.05 or seems to be confounders (more than 10% change in estimate). Final multivariable Cox model was stratified by cohort and sex. No interaction between the stratification variables and the predictor of interest (other variables in the model) was found, so we presented no subgroup analysis for each stratum.

For patients who died before the final follow-up examination or for patients lost during the follow-up, the status of the last follow-up examination was recorded. For histological analyses, two investigators (T.Q. and O.E.) performed the morphologic observations independently and blindly, after an interobserver concordance test. Immunohistological analyses were conducted by one observer (A.D.) in a blinded fashion. A P value <0.05 was considered statistically significant. Data were analyzed using the SAS packages (SAS Institute Inc version 9.4, Cary, NC).

RESULTS

Population

From ECLA and ECLAGEN cohorts, we selected 44 and 50 patients, respectively, (47 and 54 samples because of 3 and 4 bilateral surgeries, respectively) who underwent surgical femoral endarterectomy. Among these patients, 13 were excluded: one refused to give her consent for participating in this study, three presented aberrant surgical indications, five because of plaque damage (inconclusive histology analysis), and 4 did not show any calcification on histological analysis. Finally, 86 femoral plaques and 81 patients were included. Main characteristics of the population were summarized in [Table I](#). The median follow-up duration was 42.4 months [26.9–58.8]. Most of them were Rutherford stages 2 and 3 (65 limbs, 76.5%) with a mean ABI before revascularization of 0.59 ± 0.25 . The surgery consisted of aortobifemoral bypass (9%), femorofemoral or femoropopliteal bypass with local femoral endarterectomy (56%), or isolated endarterectomy and patch (35%).

Clinical Results

Twenty limbs (23.3%) were treated for critical limb ischemia (CLI). The median follow-up duration was 42.4 months [26.9–58.8]. In-hospital major complications rate was 6.2% (5 patients): 1 death (day 65); 2 major cardiac events; 2 major amputations on the index limb. At 30 days, 15 patients (9%) encountered a +3 clinical improvement, 39% a +2, and 30% a +1, while 11% did not report improvement and one reported major deterioration. At the last follow-up visit, 19 additional patients died, including 7 deaths related to a cardiovascular adverse event ([Supplemental Figure 1](#)). The survival rate was 95.0% at 1 year and 85.1% at 3 years. At 36 months, 21%, 43%, and 21% of patients reported a +3, +2, and +1 improvements; 10% reported no change, and 2 patients reported a –1 deterioration.

MACE and MALE Occurrence During Follow-Up

Twenty-three patients (28.4%) suffered from MACE, including 7 strokes, 9 myocardial infarctions, 5 unstable anginas, and 2 cardiovascular deaths ([Figs. 1 and 2](#)). A medical history of stroke or renal impairment was significantly associated with the occurrence of MACE (30%, $P = 0.001$, and 22%, $P = 0.03$, respectively) during follow-up ([Table I](#)).

Moreover, 17 patients (21.0%) suffered from 18 MALE (including 7 patients who presented both MACE and MALE, one patient suffered from MALE on each limb): 5 major amputations (median 66 days [19.5–913 days]); 5 additional bypasses; 2 graft infections (treated with allograft replacement); 1 bypass embolectomy; 2 surgical closure of false aneurysms; 6 redo surgeries due to local restenosis ([Figs. 1 and 3](#)). None of the patients' characteristics, except for the Rutherford classification, were significantly correlated with MALE.

Impact of Calcification Types on MACE and MALE Occurrence

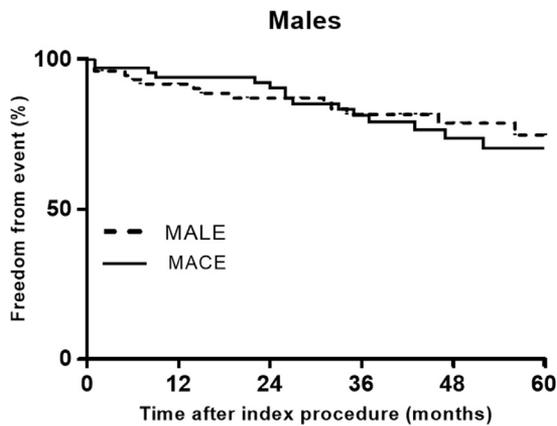
Eighty-six atheromatous plaques from 81 patients underwent histological analyses. OM was found in 41 (51%) of them. Sheet-like calcifications and nodules were identified in a large majority of the samples (78 and 81%, respectively). History of smoking were associated with no OM ($P = 0.01$). Patients with OM were older (69.8 ± 9.5 vs 64.6 ± 8.5 , respectively, $P = 0.01$). Calcifications types were similar between men and women.

Table I. Demographic and histological characteristics of patients

Characteristics	Total	MACE	<i>P</i> value	MALE	<i>P</i> value	Global mortality	<i>P</i> value
Population, <i>n</i>	81 pts & 86 limbs	23/81 pts		18/86 limbs		19/81 pts	
Male, <i>n</i> (%)	72 (89.0)	19 (83)	-	17 (94)	-	15 (79.0)	-
Age (y), mean ± SD	67.3 ± 9.3	69.7 ± 9.4	0.21	68.8 ± 8.9	0.23	70.9 ± 10.7	0.09
BMI (kg/m ²), mean ± SD	25.8 ± 4.8	26.5 ± 3	0.74	25.4 ± 3.6	0.15	25 ± 3.2	0.13
Follow-up (m), median [quartiles]	42.4 [26.9–58.8]						
History							
History of smoking, <i>n</i> (%)	32 (40)	11 (48)	0.17	8 (44)	0.86	6 (32)	0.86
HTN, <i>n</i> (%)	64 (79)	20 (87)	0.86	17 (94)	0.13	16 (84)	0.62
Dyslipidemia, <i>n</i> (%)	59 (73)	17 (74)	0.55	14 (78)	0.65	15 (79)	0.93
Diabetes, <i>n</i> (%)							
Type I	5 (6)	1 (4)	0.12	2 (11)	0.27	2 (11)	0.53
Type II	21 (26)	9 (39)		6 (33)		7 (37)	
Coronary events, <i>n</i> (%)	45 (56)	13 (57)	0.76	10 (56)	0.73	12 (63)	0.55
Cerebrovascular disease, <i>n</i> (%)	9 (11)	7 (30)	0.009*	4 (22)	0.1	4 (22)	0.37
Renal impairment, <i>n</i> (%)	12 (15)	5 (22)	0.06	3 (17)	0.36	7 (37)	0.0007*
Creatininemia (μmol/L, mean ± SD)	92.2 ± 58.8	92.3 ± 41.1	0.18	89.2 ± 47.5	0.87	129.9 ± 104.2	0.0002*
Treatments							
Statins, <i>n</i> (%)	66 (81)	18 (78)	0.43	15 (83)	0.82	17 (89)	0.95
Antiplatelet agents, <i>n</i> (%)	72 (89)	21 (91)	0.63	15 (83)	0.31	14 (74)	0.10
PAD							
Rutherford, <i>n</i> (%)							
1–3	62 (77)	15 (65)		11 (61)		9 (47)	
4	7 (9)	3 (13)	0.14	2 (11)	0.06	2 (11)	0.38
5–6	12 (15)	5 (22)		5 (28)		8 (42)	0.001*
ABI, mean ± SD	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.57	0.6 ± 0.3	0.28	0.6 ± 0.3	0.95
Surgical procedure							
Endarterectomy and patch, <i>n</i> (%)	28 (35)	6 (26)		5 (28)		5 (26)	
Ipsilateral femoral bypass, <i>n</i> (%)	46 (57)	14 (61)		11 (61)		13 (68)	
Aortobifemoral bypass, <i>n</i> (%)	7 (9)	3 (13)		2 (11)		1 (5)	
Hospital stay (d), median [quartiles]	8 [7–10]	9 [7–15]		13.3 [8–14]		10 [7–17]	

First column presents results of the whole cohort, then separated in subgroups regarding MACE, MALE, and global mortality. All values are presented as mean ± SD or median [25th – 75th percentiles] for continuous data or as number of patients (percentage) for frequency data. *P* values are considered statistically significant when <0.05 (*). *P* values were results from univariate Cox regressions with stratification on cohort and gender.

MACE, major adverse cardiac event (including cardiovascular mortality and/or unstable angina and/or myocardial infarction and/or stroke); MALE, major adverse limb event (including major above-the-ankle amputation and/or major reintervention on the index limb); y, years; m, months; d, days; BMI, body mass index; kg/m², kilograms per meter square; HTN, hypertension; PAD, peripheral artery disease; ABI, ankle/brachial index; pts, patients; n/a, not applicable; SD, standard deviation.



		0	12	24	36	48	60
MACE	Nb at risk	72	58	53	39	26	12
	% cumulative survival	100%	90,0%	86,7%	77,9%	70,6%	67,4%
MALE	Nb at risk	77	61	52	40	26	14
	% cumulative survival	100%	88,1%	83,6%	78,3%	75,5%	71,6%

Fig. 1. Kaplan-Meier curves for MACE and MALE regarding male patients.

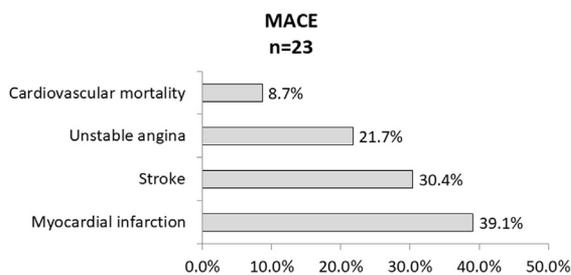


Fig. 2. Occurrence of MACE. MACE stands for major adverse cardiac event and consists of a composite endpoint constituted of cardiovascular mortality, myocardial infarction or unstable angina, stroke. Twenty-four patients (26.7%) suffered from a MACE during follow-up.

Statistical analysis with multivariate Cox models adjusted by sex and cohort did not show any significant influence of OM and microcalcifications on MALE or MACE (Table II). Sheet-like types seem to influence MACE ($P = 0.04$) but not nodule type ($P = 0.32$). A lack of nodule type was associated with MALEs ($P = 0.003$).

Biological and Histological Inflammatory Burden

Preoperative blood sample analysis of the ECLA cohort ($n = 38$ patients) showed a significantly higher rate of neutrophils within patients suffering from MALE ($P = 0.0003$; Table II) in multivariate analysis. These results correlated with histological findings about inflammatory infiltration of the

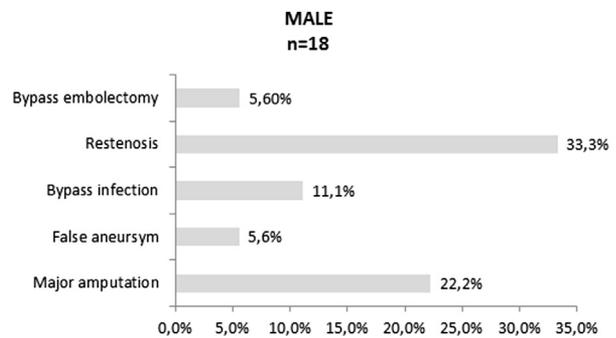


Fig. 3. Occurrence of MALE. MALE stands for major adverse limb event and is a composite endpoint constituted of each category of subscribed clinical event. Major amputations are defined by all above-the-ankle amputations of the index limb. All other criteria include major reintervention related to these causes. Eighteen limbs (21.0% patients) encountered a MALE during follow-up.

plaques. CD20+ (lymphocyte B) staining was significantly higher among patients who experienced a MACE or a MALE. No correlations were found with CD68+ staining (Fig. 4).

DISCUSSION

Arterial calcifications are associated with a higher morbi-mortality in coronary disease and with atheromatous plaque stability in the carotid territory. Clinical data are still lacking for lower limb atherosclerosis. In our study, we report the lack of significant impact of intimal calcification types on local severity or general cardiovascular condition of the patient. Especially, the presence of OM in femoral atheromatous plaque does not correlate with a higher local or general impact of the vascular disease (MACE and MALE criteria) and cannot be used as a predictor score for cardiovascular morbi-mortality. Even if more than 5000 patients would have been studied (simulation analysis), the presence of OM in femoral atheromatous plaque stay a nonsignificant predictor score for cardiovascular morbi-mortality ($n = 5265$: HR = 0.92 [0.83; 1.03], $P = 0.1425$). Sheet-like calcifications showed a trend on influencing the occurrence of a MACE and nodule calcification types on influencing MALE.

For years, appearance of VCs in atheromatous plaques has been considered as a passive phenomenon but is now known to be a highly regulated process, for which research still aims to find the precise molecular mechanisms.^{34–41} VCs and their impact on clinical status and on evolution of the

Table II. Histological and biological features for the population, MACE and MALE subgroups

Histological and biological features	Total (81)	MACE (23)	<i>P</i> value	HR (95% CI)	<i>P</i> value adjusted	MALE (18)	<i>P</i> value	HR (95% CI)	<i>P</i> value adjusted
Histological calcifications									
Microcalcifications, <i>n</i> (%)	16 (20)	3 (13)	0.53	0.50 (0.12; 2.00)	0.33	3 (17)	0.76	1.20 (0.28; 5.08)	0.80
Sheet-like calcifications, <i>n</i> (%)	63 (78)	21 (91)	0.13	9.28 (1.14; 75.2)	0.04*	15 (83)	0.69	1.367 (0.34; 5.49)	0.67
Nodules, <i>n</i> (%)	66 (81)	18 (78)	0.19	0.55 (0.17; 1.80)	0.32	12 (67)	0.04*	0.13 (0.04; 0.50)	0.003*
Osteoid metaplasia, <i>n</i> (%)	41 (51)	12 (52)	0.86	1.03 (0.31; 3.36)	0.96	9 (50)	0.74	0.763 (0.25; 2.26)	0.62
White blood cells formulae									
White blood cells (G/L), mean ± SD	7.2 ± 2.4	7.9 ± 3.3	0.10	1.17 (0.97; 1.41)	-	8.2 ± 4	0.01*	1.293 (1.05; 1.59)	-
Neutrophils (G/L), mean ± SD	4.4 ± 2.1	5.1 ± 3	0.08	1.19 (0.98; 1.44)	-	5.5 ± 3.7	0.0001*	1.60 (1.247; 2.06)	0.0003*
Lymphocytes (G/L), mean ± SD	1.9 ± 0.8	2 ± 0.9	0.13	1.478 (0.89; 2.42)	-	2 ± 1	0.62	1.15 (0.67; 1.96)	-
Monocytes (G/L), mean ± SD	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.06	8.57 (0.90; 81.6)	-	0.7 ± 0.3	0.97	1.05 (0.08; 13.4)	-
Histological inflammation									
CD20+, median [quartiles] [†]	0.7 [0.14–2.51]	1.44 [0.19–5.74]	0.04*	1.08 (1.00; 1.17)	-	1.95 [0.19–18.88]	0.03*	1.06 (1.01; 1.13)	-
CD68+, median [quartiles] [†]	1.13 [0.36–3.49]	1.54 [0.75–2.83]	0.99	1.00 (0.86; 1.16)	-	1.37 [0.48–2.34]	0.66	0.59 (0.54; 1.47)	-

First column presents results of the whole cohort then separated in subgroups regarding MACE and MALE. CD20 represents lymphocytes B cells, CD68 is a surface antigen for monocytes/macrophages.

All values are presented as mean ± SD for continuous data or as number of patients (percentage) for frequency data. For histological features, correlation was calculated and is presented as HR with its 95% confidence interval. *P* values are considered statistically significant when <0.05 (*). *P* values were results from univariate Cox analyses with stratification on cohort and gender. *P* values adjusted were results from multivariate Cox analyses with stratification on cohort. [†]*n* = 38 plaque analysis from the ECLA cohort.

MACE, major adverse cardiac event (including cardiovascular mortality and/or unstable angina and/or myocardial infarction and/or stroke); MALE, major adverse limb event (including major above-the-ankle amputation and/or major reintervention on the index limb); HR, hazard ratio; 95% CI, 95% confidence interval; G/L, giga/L or 10e6/L; SD, standard deviation.

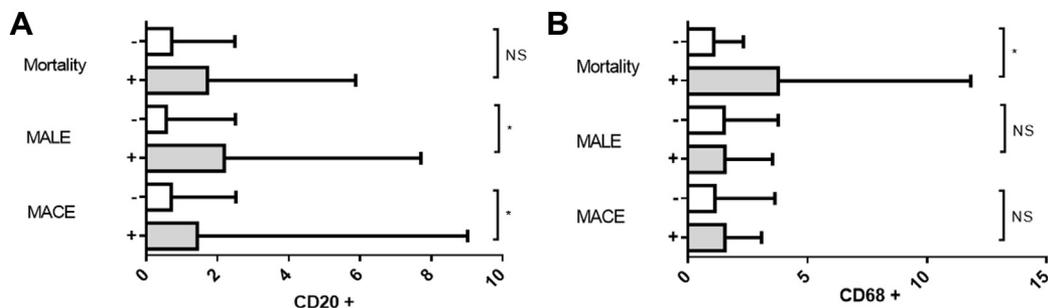


Fig. 4. Inflammation burden in femoral plaques. Box-and-whisker plots represent number of CD20+ cells (**A**) and percentage of CD68+ stained area (**B**) in femoral plaques (intima layer) of our patients, comparing the inflammation infiltration rates of B lymphocytes (CD20+) and monocytes/macrophages (CD68+) in patients who suffered (versus not) from MALE, MACE or global mortality. Infiltration of B cells was significantly correlated with the occurrence of MALE and MACE

($P=0.03$ and 0.04 , respectively). Infiltration of CD68+ cells was associated with higher mortality rate ($P=0.013$) but not with MACE or MALE. Abbreviations: MACE, major adverse cardiac event (including cardiovascular mortality and/or unstable angina and/or myocardial infarction and/or stroke); MALE, major adverse limb event (including major above-the-ankle amputation and/or major reintervention on the index limb).

cardiovascular risk have first been described on coronary arteries. Several studies have led to recognize coronary-artery calcium as an independent risk factor for cardiovascular morbidity and mortality, in both coronary and peripheral territories.^{7,10,11} Calcium score—or Agatston score⁹—can either be considered as a factor of stability or instability of the atherosclerotic plaque depending on imaging characteristics of the calcifications themselves, as well as a predictive factor for restenosis.⁴² However, such scores do not take into account calcification heterogeneity in atherosclerotic plaques. Previous studies reported that in the carotid territory, microcalcifications are related to plaque instability and a higher risk of cerebrovascular disease. In contrast, large and extensive calcification in deeper layers of the carotid plaques could stabilize the lesions.^{12,14,43}

We first reported that femoral lesions have a high prevalence of OM as compared with other arterial beds.^{6,29,30} OM has all the characteristics of fully mature bone tissue, with osteoblasts and osteocytes embedded in a dense extracellular osteoid matrix made of collagen and even fatty and vascular structures similar to bone marrow. In carotid arteries, it has been demonstrated that OM was rare but positively associated with asymptomatic, stable plaques. The authors concluded that femoral OM may have a critical impact that needs to be assessed, justifying our study.

Derksen et al. reported an inverse relation between the calcification-content and the restenosis rate after femoral endarterectomy on ultrasound duplex at 12 months.⁴⁴ In this study, 60% of femoral plaques presented with more than 40% of calcifications, and these samples were associated

with a reduced risk of restenosis, but the implication of VCs on postoperative event was not reported. In another recent study, Van Haelst et al. assessed the impact of 7 plaque histological features on secondary cardiovascular events in 497 patients undergoing iliofemoral endarterectomy.¹⁵ Histological analysis included calcifications but not calcification types. Calcified plaques were univariably associated with secondary cardiovascular events, but not in multivariable analysis. To complete such analyses, we decided to focus on calcification type and test whether different subtypes of calcifications—especially OM—were associated with more postoperative clinical events (both locally and systemically).

Pathophysiology of atherosclerosis is widely reckoned as a progressive inflammatory-lipid disorder with recruitment of macrophages (innate immunity) and T cells (adaptive immunity) in the early stages.^{21,22,45} Hypotheses have emerged to explain and relate calcification burden with inflammation in the artery wall, with main cell candidates being macrophages and vascular smooth muscle cells (VSMCs). Indeed, macrophages can release matrix vesicles that could mediate calcium and phosphate nucleation and can show some osteoclastic properties,^{46–48} while VSMCs can transdifferentiate into osteochondrogenic cells.^{49,50} On the other hand, the presence of calcification can also trigger and sustain local inflammation, with production of proinflammatory cytokines (interleukin [IL]-1, IL-6).⁵¹ In the early stages of atherosclerosis, monocytes infiltrate the intima layer of artery walls where they turn into macrophages that ingest oxidized low-density lipoproteins (LDLs) and become foam cells. Later on, macrophages can also produce

cytokines that perpetuate the inflammation process locally, and MMPs that degrade collagen matrix, hence favoring microcalcification, plaque destabilization, and ultimately rupture.^{21,34,45} In humans, macrophages (expressing CD68 cell marker) can be separated into at least two subtypes called M1 and M2.^{52,53} In the carotid arteries, CD68+ staining is higher in unstable, symptomatic plaques⁵⁴ and displays mostly an M1 phenotype, while M2 macrophages are associated with stable asymptomatic carotid plaques.⁵⁵ When compared with the femoral territory, CD68+ staining is higher in carotid plaques (they are more cellular)⁶ and associated with a high presence of M1 macrophages, while femoral plaques show more M2 macrophages.²⁴

Several small populations of innate immune cells have important roles at different stages of atherosclerosis development, but macrophages are the main innate immune effector cell type in the plaque. T cells that respond to autoantigenic components of LDL particles orchestrate plaque development: T helper type 1 (TH1) cells promote atherosclerosis, regulatory T cells are protective, and TH17 cells promote plaque stability. Many connections between the immune system and metabolism exist; acute inflammation induces hypertriglyceridemia, whereas chronic inflammation has more complex effects. Novel approaches such as anti-inflammatory therapies, T-cell-based treatments, or vaccination against LDL could potentially reduce cardiovascular inflammation and protect against the development of atherosclerosis.

Following these hypotheses, we decided to look more specifically for inflammation characteristics in patients' preoperative blood and histological samples. Interestingly, we found a significant correlation between the monocytes blood count and secondary cardiovascular adverse events. Concordantly, Dopheide et al. found an increase in circulating proinflammatory monocytes count in patients suffering from CLI, speculating that systemic inflammation in atherosclerosis might increase the severity of the disease.⁵⁶ Zimmermann et al. demonstrated an increase in CD68+ cells within femoral plaques from patients with CLI, but this finding was not confirmed by our histological analysis of CD68+.⁵⁷ Additional analyses with specific staining of macrophage subtypes are required to better understand the monocyte/macrophage infiltration of femoral plaques and its role on secondary cardiovascular events. In contrast, our analysis of CD20+ was significantly associated with MACE and MALE. Humoral immunity B cells are known from mice experimentations to be involved

with atherosclerosis and B-cell depletion to protect against atherosclerosis. Moreover, patients with splenectomy are at higher risk of death by myocardial infarction,⁵⁸ and we know from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS) trial that in human, modulation of the IL-6 signaling pathway, at least with canakinumab, associates with reduced cardiovascular event rates, independent of lipid lowering.⁵⁹ We confirm these results in our CD20+ histological analysis, with a significantly higher risk of MALE and MACE among patients with high B-cell infiltration. These results are encouraging to develop novel clinical approaches such as antiinflammatory therapies or B- or T-cell-based treatment or vaccination that could potentially reduce cardiovascular inflammation and protect against the development of atherosclerosis.

This study has several limitations. First is the retrospective design of the study regarding long-term clinical follow-up. Despite a big work of recovery, some patients remained lost for follow-up. Analyses were made on 81 patients maximum. We lack power to show effect of calcifications on cardiovascular adverse events. Moreover, most of the patients are claudicants, less likely than patients with CLI to suffer from reinterventions and amputations. Looking specifically into this population may lead to different results. Also, we did not examine different slides in a single patient. The assumption that the examination of the culprit lesion is consistent in the total plaque might be a study limitation. Finally, extrapolation of our results to female patients is severely limited because of the very low number of female patients⁹ in our cohorts.

To conclude, OM, an osteochondral calcification found preferentially in the common femoral artery, does not appear to impact the occurrence of secondary adverse cardiovascular events. In our findings, systemic patients' blood monocyte count may have a predictive impact, with a significant correlation with CD20+ (lymphocyte B) plaque infiltrates and adverse cardiovascular events. More studies are required to assess the predictive value of atheromatous plaque features on mid- and long-term secondary cardiovascular adverse events in the lower limb territory.

The authors thank Carine Montagne, Flavien Gautron, and Manon Pondjikli for the management of biocollections and Marja Steenman for the microarray data. They also value the assistance of the cellular and tissue imaging core facility of Nantes University (MicroPICell) for immunofluorescence

imaging. This work was funded by the Allocation Nationale de Recherche (ANR) (Paris, France) for physiopathology and by an interregional Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC). T.Q. received financial support from the European Commission (Marie Skłodowska-Curie Actions, Individual Fellowships), the Fondation de l'Avenir (Paris, France), the University Hospital of Nantes (Nantes, France), and the Fédération Française de Cardiologie (Paris, France). A.D. was supported by an "Année-Recherche" Grant (Université de Nantes, Nantes, France) and the Société Française de Chirurgie Vasculaire et Endovasculaire (Paris, France).

Competing interests: B.M. has been paid a consulting/honorarium by Cook. Y.G. has been paid research grants by Abbott, Bard, Medtronic, Terumo, and W. L. Gore and has been paid a consulting/honorarium by Abbott, Bard, Biotronik, Boston Scientific, Cook, Medtronic, Vygon, Spectranetics, Terumo, and W. L. Gore.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2019.03.035>.

REFERENCES

1. WHO. World Health Statistics 2014. Geneva: World Health Organization, 2014. pp 45–6.
2. Fowkes FGR, Rudan D, Rudan I, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *The Lancet* 2013;382:1329–40.
3. Knowles JW, Assimes TL, Li J, et al. Genetic susceptibility to peripheral arterial disease: a dark corner in vascular biology. *Arteriosclerosis, Thromb Vasc Biol* 2007;27:2068–78.
4. Dalager S, Paaske WP, Bayer Kristensen I, et al. Artery-related differences in atherosclerosis expression: implications for atherogenesis and dynamics in intima-media thickness. *Stroke* 2007;38:2698–705.
5. Gouëffic Y, Davaine JM, Merlini T, et al. Artériopathie et hétérogénéité artérielle. *La Revue de Médecine Interne* 2013;34:61–5.
6. Herisson F, Heymann MF, Chétiveaux M, et al. Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. *Atherosclerosis* 2011;216:348–54.
7. Rennenberg RJMW, Kessels AGH, Schurgers LJ, et al. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis. *Vasc Health Risk Management* 2009;5:185–97.
8. Aboyans V, Ricco J-B, Bartelink M-LEL, et al. Editor's choice – 2017 ESC guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2018;55:305–68.
9. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, et al. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:827–32.
10. Allison MA, Hsi S, Wassel CL, et al. Calcified atherosclerosis in different vascular beds and the risk of mortality. *Arteriosclerosis, Thromb Vasc Biol* 2011;32:140.
11. Criqui MH, Denenberg JO, Ix JH, et al. Calcium density of coronary artery plaque and risk of Incident cardiovascular events. *JAMA* 2014;311:271.
12. Martin SS, Blaha MJ, Blankstein R, et al. Dyslipidemia, coronary artery calcium, and Incident atherosclerotic cardiovascular disease: clinical perspective: implications for statin therapy from the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation* 2014;129:77–86.
13. Davaine J-M, Quillard T, Brion R, et al. Osteoprotegerin, pericytes and bone-like vascular calcification are associated with carotid plaque stability. *PLoS ONE* 2014;9:e107642.
14. Wong KK, Thavornpattanapong P, Cheung SC, et al. Effect of calcification on the mechanical stability of plaque based on a three-dimensional carotid bifurcation model. *BMC Cardiovasc Disord* 2012;12.
15. van Haelst STW, Haitjema S, Derksen W, et al. Atherosclerotic plaque characteristics are not associated with future cardiovascular events in patients undergoing iliofemoral endarterectomy. *J Vasc Surg* 2018;67:809–816.e1.
16. Maldonado N, Kelly-Arnold A, Cardoso L, et al. The explosive growth of small voids in vulnerable cap rupture; cavitation and interfacial debonding. *J Biomech* 2013;46:396–401.
17. Thondapu V, Bourantas CV, Foin N, et al. Biomechanical stress in coronary atherosclerosis: emerging insights from computational modelling. *Eur Heart J* 2017;38:81–92.
18. Libby P, Pasterkamp G. Requiem for the 'vulnerable plaque'. *Eur Heart J* 2015;36:2984–7.
19. Quillard T, Araujo HA, Franck G, et al. TLR2 and neutrophils potentiate endothelial stress, apoptosis and detachment: implications for superficial erosion. *Eur Heart J* 2015;36:1394–404.
20. Yahagi K, Kolodgie FD, Otsuka F, et al. Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2016;13:79–98.
21. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thromb Vasc Biol* 2012;32:2045–51.
22. Wigren M, Nilsson J, Kolbus D. Lymphocytes in atherosclerosis. *Clinica Chim Acta* 2012;413:1562–8.
23. Chinetti-Gbaguidi G, Daoudi M, Rosa M, et al. Human alternative macrophages populate calcified areas of atherosclerotic lesions and display impaired RANKL-induced osteoclastic bone resorption activity. *Circ Res* 2017;121:19–30.
24. Shaikh S, Brittenden J, Lahiri R, et al. Macrophage subtypes in symptomatic carotid artery and femoral artery plaques. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012;44:491–7.
25. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* 2007;116:2841–50.
26. Willems S, Vink A, Bot I, et al. Mast cells in human carotid atherosclerotic plaques are associated with intraplaque microvessel density and the occurrence of future cardiovascular events. *Eur Heart J* 2013;34:3699–706.
27. Scholtes VP, Johnson JL, Jenkins N, et al. Carotid atherosclerotic plaque matrix metalloproteinase-12-positive macrophage subpopulation predicts adverse outcome after endarterectomy. *J Am Heart Assoc* 2012;1:e001040.
28. Meeuwse JAL, van Duijvenvoorde A, Gohar A, et al. High Levels of (Un)Switched Memory B cells are associated with better outcome in patients with advanced atherosclerotic disease. *J Am Heart Assoc* 2017;6:e005747.
29. Davaine JM, Quillard T, Chatelais M, et al. Bone like arterial calcification in femoral atherosclerotic lesions: prevalence

- and role of osteoprotegerin and pericytes. *Eur J Vasc Endovascular Surg* 2016;51:259–67.
30. Espitia O, Chatelais M, Steenman M, et al. Implication of molecular vascular smooth muscle cell heterogeneity among arterial beds in arterial calcification. *PLoS One* 2018;13:e0191976.
 31. Conte MS, Geraghty PJ, Bradbury AW, et al. Suggested objective performance goals and clinical trial design for evaluating catheter-based treatment of critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 2009;50:1462–1473.e3.
 32. Pentecost MJ, Criqui MH, Dorros G, et al. Guidelines for peripheral percutaneous transluminal angioplasty of the abdominal aorta and lower extremity vessels. A statement for health professionals from a special writing group of the Councils on Cardiovascular Radiology, Arteriosclerosis, Cardio-Thoracic and Vascular Surgery, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention, the American Heart Association. *Circulation* 1994;89:511–31.
 33. Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, et al. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. *J Vasc Surg* 1997;26:517–38.
 34. Hutcheson JD, Goettsch C, Bertazzo S, et al. Genesis and growth of extracellular-vesicle-derived microcalcification in atherosclerotic plaques. *Nat Mater* 2016;15:335–43.
 35. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res* 2011;109:e1–12.
 36. Goettsch C, Hutcheson JD, Aikawa M, et al. Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles. *J Clin Invest* 2016;126:1323–36.
 37. Aghagolzadeh P, Bachtler M, Bijarnia R, et al. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α . *Atherosclerosis* 2016;251:404–14.
 38. Strom A, Ahlqvist E, Franzen A, et al. Extracellular matrix components in atherosclerotic arteries of Apo E/LDL receptor deficient mice: an immunohistochemical study. *Histoloy and histopathology* 2004;19:337–47.
 39. Lei Y, Sinha A, Nosoudi N, et al. Hydroxyapatite and calcified elastin induce osteoblast-like differentiation in rat aortic smooth muscle cells. *Exp Cel Res* 2014;323:198–208.
 40. Houben E, Neradova A, Schurgers LJ, et al. The influence of phosphate, calcium and magnesium on matrix Gla-protein and vascular calcification: a systematic review. *G Ital Nefrol* 2016;33:1–10.
 41. Fakhry M, Roszkowska M, Briolay A, et al. TNAP stimulates vascular smooth muscle cell trans-differentiation into chondrocytes through calcium deposition and BMP-2 activation: possible implication in atherosclerotic plaque stability. *Biochim Biophys Acta Mol basis Dis* 2017;1863:643–53.
 42. Greenland P, Bonow RO, Brundage BH, et al. ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment and in evaluation of patients with chest pain: a report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography) developed in collaboration with the Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention and the Society of Cardiovascular Computed Tomography. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:378–402.
 43. Maldonado N, Kelly-Arnold A, Vengrenyuk Y, et al. A mechanistic analysis of the role of microcalcifications in atherosclerotic plaque stability: potential implications for plaque rupture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;303:H619–28.
 44. Derksen WJM, de Vries JPPM, Vink A, et al. Histologic atherosclerotic plaque characteristics are associated with restenosis rates after endarterectomy of the common and superficial femoral arteries. *J Vasc Surg* 2010;52:592–9.
 45. Taleb S. Inflammation in atherosclerosis. *Arch Cardiovasc Dis* 2016;109:708–15.
 46. Chen Q, Bei J-J, Liu C, et al. HMGB1 induces secretion of matrix vesicles by macrophages to enhance ectopic mineralization. *PLoS One* 2016;11:e0156686.
 47. Lee B, Iwaniec UT, Turner RT, et al. RIP140 in monocytes/macrophages regulates osteoclast differentiation and bone homeostasis. *JCI Insight* 2017;2.
 48. New SEP, Goettsch C, Aikawa M, et al. Macrophage-Derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2013;113:72–7.
 49. Albarrán-Juárez J, Kaur H, Grimm M, et al. Lineage tracing of cells involved in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2016;251:445–53.
 50. Chatrou MLL, Cleutjens JP, van der Vusse GJ, et al. Intrasection analysis of human coronary arteries reveals a potential role for micro-calcifications in macrophage recruitment in the early stage of atherosclerosis. *PLoS One* 2015;10:e0142335.
 51. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 2008;117:2938–48.
 52. Libby P, Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. *Semin Immunopathol* 2013;35:553–62.
 53. Randolph GJ. Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. *Circ Res* 2014;114:1757–71.
 54. Ren S, Fan X, Peng L, et al. Expression of NF- κ B, CD68 and CD105 in carotid atherosclerotic plaque. *J Thorac Dis* 2013;5:771–6.
 55. Cho KY, Miyoshi H, Kuroda S, et al. The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2013;22:910–8.
 56. Dopheide JF, Rubrech J, Trumpp A, et al. Leukocyte-platelet aggregates—a phenotypic characterization of different stages of peripheral arterial disease. *Platelets* 2016;27:658–67.
 57. Zimmermann A, Senner S, Eckstein HH, et al. Histomorphological evaluation of atherosclerotic lesions in patients with peripheral artery occlusive disease. *Adv Med Sci* 2015;60:236–9.
 58. Gistera A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol* 2017;13:368–80.
 59. Ridker PM, Libby P, MacFadyen JG, et al. Modulation of the interleukin-6 signalling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all-cause mortality: analyses from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Eur Heart J* 2018;39:3499–507.

Titre de Thèse : Corrélation entre l'ossification de l'artère fémorale commune et la sévérité des complications vasculaires systémiques et des membres inférieurs chez les patients opérés.

RÉSUMÉ

Les calcifications vasculaires, facteur prédictif indépendant de morbi-mortalité cardiovasculaire en territoire coronarien, sont plus nombreuses en territoire fémoral avec la présence de métaplasie ostéoïde (MO). Le but de ce projet de thèse est d'évaluer l'impact clinique de la présence de MO et d'inflammation en fémoral.

Entre 2008 et 2015, 86 échantillons de plaques recueillis au cours d'endartérectomies fémorales sur 81 patients ont été analysés et corrélés au suivi des patients à long terme, incluant les événements cardiovasculaires locaux (*Major Adverse Limb Events*, MALE) et systémiques (*Major Adverse Cardiac Events*, MACE).

Bien que présente dans 50% des plaque d'athérome fémorale, la MO ne semble pas être un facteur indépendant d'événement cardiovasculaire local ou systémique, contrairement à l'infiltration de la plaque par les lymphocytes B significativement associée aux évènements MACE et MALE.

MOTS-CLES

CALCIFICATIONS VASCULAIRES — METAPLASIE OSTEOÏDE — INFLAMMATION - ARTERIOPATHIE OBLITERANTE DES MEMBRES INFÉRIEURS

VASCULAR CALCIFICATIONS — OSTEOID METAPLASIA — INFLAMMATION BURDEN — PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE