



**HAL**  
open science

# Cellule interstitielle de valve et sténose aortique : impact de la voie du facteur tissulaire

Anais Arbesu y Miar

## ► To cite this version:

Anais Arbesu y Miar. Cellule interstitielle de valve et sténose aortique : impact de la voie du facteur tissulaire. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S062 . tel-01883825

**HAL Id: tel-01883825**

**<https://theses.hal.science/tel-01883825>**

Submitted on 28 Sep 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE LILLE 2 – DROIT ET SANTE  
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE**

**DOCTORAT DE BIOLOGIE CELLULAIRE,  
BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT ANIMAL**

**Biologie Cellulaire**

**ANAI S ARBESU Y MIAR**

**CELLULE INTERSTITIELLE DE VALVE ET STENOSE AORTIQUE :  
IMPACT DE LA VOIE DU FACTEUR TISSULAIRE.**

**Thèse dirigée par le Professeur Eric VAN BELLE  
et le Docteur Delphine CORSEAU X.**

**Université Lille 2**

**Thèse soutenue le 16 décembre 2015**

**JURY**

**Professeur Thierry Le Tourneau**

**Rapporteur**

**Professeur David Smadja**

**Rapporteur**

**Docteur Delphine Corseaux**

**Examineur**

**Professeur Bart Staels**

**Examineur**

A mes parents  
qui n'ont jamais fait que s'assurer  
de mettre toutes les chances de mon côté.  
Merci à eux pour tous les sacrifices réalisés  
en vue de m'assurer la concrétisation de mes projets.  
Merci à eux d'avoir toujours cru en moi.

*« On ne peut donner que  
deux choses à ses enfants:  
des racines et des ailes ».*  
-Proverbe juif-

A mes grands-parents.  
*« Un homme sans ancêtres  
est un arbre sans racines,  
un ruisseau sans source ».*  
-Proverbe chinois-

*« L'impossible,  
nous ne l'atteignons pas,  
il nous sert de lanterne ».*  
René Char

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le **Professeur Brigide Jude**, le **Professeur Sophie Susen** et le **Professeur Bart Staels** pour m'avoir accueilli au sein de leurs unités de recherche : l'EA-2693 « interface sang vaisseaux et réparation cardiovasculaire » et l'UMR 1011 « Récepteurs nucléaire, Maladies Cardiovasculaires et Diabète ».

Je remercie également mes directeurs de thèse, le **Professeur Eric Van Belle** et le **Docteur Delphine Corseaux**. Merci de m'avoir accueillie comme doctorante et de m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse. Merci également pour votre patience et votre soutien, essentiels quand cela a été plus rude.

Je remercie bien évidemment mes rapporteurs de thèse, le **Professeur Thierry Le Tourneau** de l'Université de Nantes et le **Professeur David Smadja** de l'Université Paris Descartes. C'est un honneur de vous avoir dans mon jury de thèse.

Je remercie également l'**Université Lille 2** et la **Nouvelles Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA)** pour m'avoir financée tout au long de cette thèse.

Je n'aurai jamais pu réaliser cette thèse si, à la fin de l'année 2011, le **Docteur Joke Breyne** ne m'avait pas acceptée en stage au sein de l'EA-2693. Bien qu'en définitive, nous n'avons pas travaillées ensemble ; sa confiance m'a permis d'intégrer cette équipe.

Je remercie également le **Docteur Frédéric Mouquet**. Merci pour les relectures et les conseils qui ont permis l'amélioration indéniable de l'article « From human aortic valves to valvular interstitial cells: in vitro behavior and cell subpopulation discrimination. » et de cette thèse.

A **mes collègues** de l'EA-2693 et de l'UMR 1011, merci. Cette thèse est aussi le fruit d'un travail collaboratif fructueux. A la **VIC-team**, merci à vous pour ces 3 années inoubliables. Merci de m'avoir supportée lorsque j'en avais besoin, d'avoir partagé toutes les joies que ces 3 années m'ont apportées et, surtout, d'avoir supporté mes coups de blues et mes craintes grandissantes à l'approche de la fin. Ce fut jusqu'au bout un plaisir de venir au laboratoire grâce à vous (même lors de la maroilles war).

Plus particulièrement, je remercie le **Docteur Rodrigo Lorenzi**. Au-delà de ton statut de post-doctorant, l'aide que tu m'as apportée a permis la concrétisation de cette thèse.

Je remercie également **Mickael Rosa** pour m'avoir permis d'utiliser sa superbe figure résumant la physiopathologie de la sténose aortique.

Plus personnellement, je remercie **ma famille**. Sans eux, je ne serais définitivement pas arrivée là. Cela n'a pas toujours été facile mais, malgré la distance, vous avez toujours su être là pour moi

A **Simon**, merci pour ton soutien sans faille tout au long de ces 2 années.

A mes colocataires : **Marie, Charles, Mathieu** ; merci pour l'année transition au sein de cette coloc' de grands malades. La soirée mexicaine restera ma préférée. A **Katherini** et **Maxime** ; merci pour ses soirées tranquilles et nos raclettes-party. A **Cécile** et **Charlotte** ; merci pour votre soutien dans la dernière ligne droite et dans l'adversité de ce week-end sans chauffage. Merci à vous tous d'avoir rendu ma vie quotidienne lilloise si sympathique.

Et puis, « *Il était une fois la VICs* »...

## **RESUME EN ANGLAIS**

### **Valvular interstitial cell and aortic stenosis: impact of tissue factor pathway**

Defined as the narrowing of the aortic valve, aortic stenosis (AS) is the third cardiovascular pathology in industrialized countries. Affecting mainly people aged over 65 years, AS represents a major public health problem because of the aging of the population. After initially been considered as a passive degenerative process, it is now established that AS is an "atherosclerosis-like" disease characterized by the processes of inflammation, fibrosis, neo-angiogenesis and calcification. Some proteins of the coagulation pathway such as tissue factor (TF) are known to have a pro-fibrotic role and actively participate in the development of atherosclerotic lesions. Their implication in AS seems, therefore, probable and remain to be identified.

Prevalent cellular component of the aortic valve, VICs have five distinct subpopulations: embryonic progenitor cells (EPCs), progenitor cells (pVICs) quiescent (qVICs), activated (aVICs) and osteoblastic (obVICs). During the valvulogenesis, EPCs allow the cellularization of the valve, differentiating into qVICs. These cells maintain the valvular homeostasis and, in case of damage, are activated (aVICs) to effectively repair the valve tissue. The valvular inflammation and VICs activation initiate the secretion of pro-calcifying proteins inducing the differentiation of aVICs into obVICs. Finally, pVICs, naturally present within the valve (called resident) or from the blood circulation (called hematopoietic), seem to promote cell renewal and may be involved in the angiogenic and osteoblastic processes.

Although described, these subpopulations have never been studied longitudinally, in respect to their behavior in vitro. Our first objective was to perform this investigation. Our second objective was to study the potential role of TF pathway in the deleterious mechanisms of AS.

As part of the longitudinal follow-up of VICs from control and pathological human aortic valves to the in vitro culture performed on plastic and collagen, we first showed that different subpopulations were present in these valves with different locations and proportions according to the pathophysiological state of the tissue. After enzymatic digestion, all subpopulations are found but, in culture, hematopoietic pVICs disappeared, whichever the support. Thus, we validated the primary culture model of VICs while highlighting its limitations: lack of hematopoietic pVICs, spontaneous osteoblastic differentiation and activation of VICs in culture.

As part of the study the involvement of TF in the AS development, we showed its colocalization with thrombin and calcifications of pathological valves. We showed that the expression and activity of TF were constitutively more important in VICs from fibrocalcified valves than control ones and that IL1 $\beta$  for pathological VICs and that its expression could be induced by IL1 $\beta$ . In addition, TF activation in the by its ligand FVII, induced the expression of fibronectine,  $\beta$ -caténine and RUNX2, proteins implicated in the processes of fibrosis and calcification. Thus, our findings suggest that the TF expressed by VICs mediates fibrocalcific processes of aortic stenosis.

# TABLE DES MATIERES

ABBREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION GENERALE.....	15
I. La valve aortique.....	15
1. Situation anatomique et rôle.....	15
2. Particularités de la valve aortique vis-à-vis des autres valves cardiaques. ....	16
3. Valvulogenèse.....	17
3.1. Généralités.....	17
3.2. Mécanismes moléculaires. ....	21
3.2.1 Gonflement des bourgeons endocardiques et EMT.....	22
3.2.2 Cellularisation et excavation des cuspidés.....	24
3.2.3 Maturation des cuspidés en formation. ....	25
4. Physiologie de la valve aortique.....	27
4.1. Généralités.....	27
4.2. Environnement hémodynamique.....	28
4.3. Structure histologique. ....	29
4.3.1 L'endothélium.....	30
4.3.2 La ventricularis. ....	30
4.3.3 La spongiosa. ....	31
4.3.4 La fibrosa .....	31
4.4. Composantes cellulaires.....	32
4.4.1 Les cellules endothéliales valvulaires (VECs).....	32
4.4.2 Les cellules périvasculaires.....	33
4.4.3 Les cellules interstitielles de valve (VICs). ....	34
(a) Les VICs progénitrices (pVICs). ....	34

(b)	Les VICs quiescentes (qVICs).....	34
(c)	Les VICs activées (aVICs).....	35
(d)	Les VICs ostéoblastiques (obVICs).....	36
II.	La sténose aortique.....	36
1.	Généralités.....	36
1.1.	Prévalence.....	38
1.2.	Etiologie.....	39
1.3.	Facteurs de risque.....	39
1.3.1	Anomalies structurelles.....	40
1.3.2	Facteurs de risques génétiques.....	41
1.3.3	Facteurs de risque acquis.....	42
1.4.	Symptomatologie et diagnostic.....	43
1.5.	Traitements.....	45
2.	Physiopathologie.....	46
2.1.	Mécanismes physiopathologiques.....	47
2.1.1	Inflammation.....	48
2.1.2	Fibrose et remaniement de l'ECM.....	49
2.1.3	Néo-angiogenèse.....	51
2.1.4	Calcifications.....	51
III.	Le facteur tissulaire (FT).....	55
1.	Physiologie du FT.....	55
1.1.	Généralités.....	55
1.2.	Gène du FT.....	55
1.3.	Protéine du FT.....	56
1.3.1	Le domaine extracellulaire.....	57
1.3.2	Le domaine transmembranaire.....	58

1.3.3	Le domaine intracytoplasmique.....	58
1.4.	Expression du FT. ....	59
1.5.	Régulation de l'expression du FT. ....	59
1.5.1	Régulation positive. ....	59
1.5.2	Régulation négative. ....	61
1.6.	Rôles du FT. ....	61
1.6.1	Dans le processus de coagulation. ....	61
1.6.2	Dans la signalisation cellulaire. ....	62
1.6.3	Dans la migration cellulaire et l'angiogenèse. ....	64
1.6.4	Dans la fibrose. ....	65
2.	FT et athérosclérose. ....	66
2.1.	Rappel sur l'athérosclérose. ....	66
2.2.	Implication du FT dans la pathologie athéroscléreuse.....	67
3.	Implication du FT dans la Sao.....	69
OBJECTIFS	.....	71
ARTICLES	.....	72
I.	From human aortic valves to valvular interstitial cells: <i>in vitro</i> behavior and cell subpopulation discrimination. ....	73
II.	Tissue Factor mediates the commitment of human valve interstitial cells to profibrotic and procalcific processes.....	94
DISCUSSION	.....	105
I.	Caractérisation du tissu valvulaire aortique contrôle et fibrocalcifié. ....	105
II.	Culture <i>in vitro</i> des VICs : avantages et inconvénients du modèle.....	107
III.	Transformation <i>in vitro</i> des VICs : « mimétisme » des conditions physiopathologiques ?.....	112
IV.	Facteur tissulaire, VICs et sténose aortique. ....	115

VI. Discussion générale.....	118
CONCLUSION.....	122
PERSPECTIVES.....	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	124

## ABREVIATIONS

$\alpha$ SMA	<i><math>\alpha</math> Smooth Muscle Actin</i>
$\beta$ cat	$\beta$ -caténine
AA	Acide Aminé
ACE	<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>
ADAMTS	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin MoTifs</i>
ALP	<i>AlkaLin Phosphatase</i>
AMPC/PKA	Adénosine MonoPhosphate cyclique / Protéine Kinase A
ANGII	ANGiotensine II
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
ARN	<i>Acid RiboNucleic</i>
AT1	récepteur de Type 1 de l'angiotensine II
AV	Atrio-Ventriculaire
aVICs	<i>activated Valvular Interstitial Cells</i>
BE	Bourgeon Endocardique
BMPs	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CMLs	Cellules Musculaires Lisses
CRP	<i>C-Reactive Protein</i>
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGR-1	<i>Early Growth Region-1</i>

EMT	<i>Endothelial Mesenchymal Transition</i>
eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ENPP1	<i>EctoNucleotide Pyrophosphate/Phosphodiesterase 1</i>
<i>E-selectin</i>	<i>Endothelial selectin</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FT	Facteur tissulaire
FZD	<i>FriZzleD</i>
GAGs	GlycosAminoGlycanes
GSK3 $\beta$	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 <math>\beta</math></i>
HDLs	<i>High Density Lipoproteins</i>
HMG-Coa	Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme a
HSP47	Heat Shock Protein 47
IL	InterLeukine
IL1 $\beta$	InterLeukine 1 $\beta$
LDLs	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LOX1	<i>lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1</i>
LpA	Lipoprotéine A
LPC	LysoPhosphatidylCholine
Lp-PLA2	<i>Lipoprotein-associated PhosphoLipase A2</i>
LRE	<i>Lipopolysaccharide Response Element</i>
MMPs	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
MSGT2	<i>Microsomal glutathione S-transferase 2</i>
MT-MMPs	<i>Membrane-Type Matrix Metalloproteinases</i>
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T Cells</i>

NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NG2	<i>Neural Glial antigen 2</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
OB-CDH	<i>OsteoBlast CaDHerin</i>
obVICs	<i>osteoblastic VICs</i>
OD	Oreillette droite
OG	Oreillette Gauche
OMD	OstéoMoDuline
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OP	Oreillette Primitive
PAR	<i>Protease Activated Receptor</i>
PEG	PolyEthylène Glycol
PPARγ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ</i>
PPi	PyroPhosphate inorganique
PS	PhosphatidylSérines
pVICs	<i>progenitor Valvular Interstitial Cells</i>
qVICs	<i>quiescent Valvular Interstitial Cells</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand</i>
Rao	Rétrécissement aortique.
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
Sao	Sténose aortique
SMM	<i>Smooth Muscle Myosin</i>
Sp-1	<i>Stimulating protein-1</i>
SSEA4	<i>Stage-Specific Embryonic Antigen 4</i>
SSR	<i>Serum Response Region</i>

TAVI	<i>Transcatheter Aortic Valve Implantation</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIMPs	<i>Tissue Inhibitor of MetalloProteinases</i>
TLR	<i>Tool Like Receptor</i>
TNF $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
t-PA	<i>tissue Plasminogen Activator</i>
Trx	Thioredoxine
TXNIP	<i>ThioredoxiNe-Interacting Protein</i>
u-PA	<i>urokinase-type Plasminogen Activator</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VD	Ventricule Droit
VECs	<i>Valvular Endothelial Cells</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VG	Ventricule Gauche
VICs	<i>Valvular Interstitial Cells</i>
VLDLs	<i>Very Low Density Lipoproteins</i>
VP	Ventricule primitif

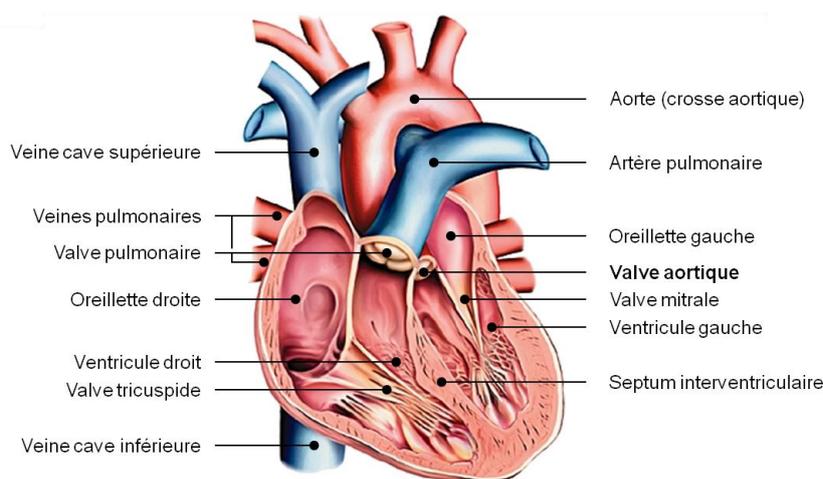
# INTRODUCTION GENERALE

## I. La valve aortique.

### 1. Situation anatomique et rôle.

La valve aortique fait partie du système cardiovasculaire. Située entre le ventricule gauche et l'aorte, elle est la jonction entre le système cardiaque et le système vasculaire où elle assure le flux unidirectionnel du sang.

Le cœur humain est un organe musculaire creux responsable de la circulation sanguine à travers l'ensemble de l'organisme par sa fonction de « pompe ». Il collecte le sang appauvri en oxygène *via* les veines caves pour l'envoyer aux poumons *via* l'artère pulmonaire. Oxygéné, le sang est renvoyé au cœur *via* les veines pulmonaires pour être ensuite envoyé dans la circulation sanguine systémique *via* l'aorte. Le cœur se distingue ainsi en 2 parties : le « cœur droit » responsable du transfert du sang « pauvre » en oxygène et le « cœur gauche » responsable du transfert du sang « riche » en oxygène. Morphologiquement symétriques, ces 2 parties sont constituées de 2 cavités : l'oreillette au niveau supérieur et le ventricule au niveau inférieur. Toutes 2 sont séparées par les valves auriculo-ventriculaires (ou atrio-ventriculaires) que sont les valves tricuspides et mitrales. Elles empêchent le reflux sanguin lors de la contraction ventriculaire (systole ventriculaire). Enfin, les valves artérielles (ou semi-lunaires), constituées des valves pulmonaire et aortique, séparent les ventricules des artères pulmonaire et aortique afin d'empêcher le reflux sanguin lors de la relaxation ventriculaire (diastole ventriculaire) (**Figure 1**).

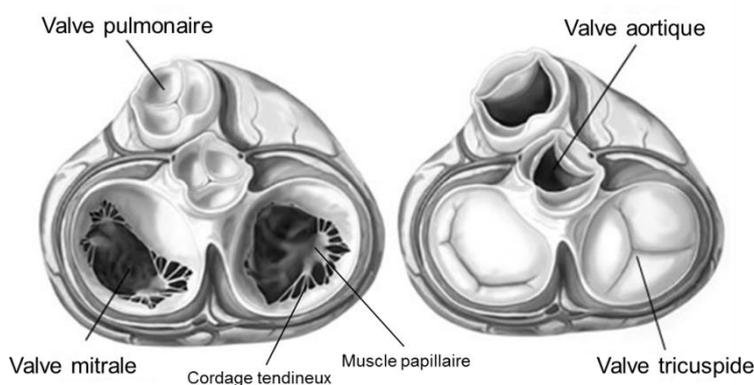


**Figure 1 : Le cœur et les valves cardiaques.** Coupe cardiaque en vue sagittale. Les vaisseaux sanguins en bleu appartiennent au « cœur droit » et les vaisseaux sanguins en rouge appartiennent au « cœur gauche ». D'après le dessin de Michel Saemann - Archives Larousse [en ligne]

<http://www.larousse.fr/encyclopedie/divers/c%C5%93ur/34926>

## **2. Particularités de la valve aortique vis-à-vis des autres valves cardiaques.**

Les valves aortiques et pulmonaires se distinguent l'une de l'autre par leur localisation et donc, leurs fonctions. La valve aortique appartient ainsi au « cœur gauche », où elle permet le transfert du sang riche en oxygène vers les différents organes du corps humain tandis que la valve pulmonaire appartient au « cœur droit », où elle permet le transfert du sang « pauvre en oxygène » vers les poumons. Néanmoins, d'un point de vue anatomique et histologique, ces valves sont identiques puisqu'issues du même processus de valvulogénèse. Elles sont toutes deux constituées de 3 cuspidés, également appelées sigmoïdes ou valvules (**Figure 2**). Ces feuillets tissulaires régulent le flux unidirectionnel du sang puisqu'elles s'ouvrent uniquement lorsque la pression du sang dans le ventricule atteint 120 mmHg (Misfeld and Sievers 2007). D'un point de vue pathologique, les valves artérielles sont essentiellement sujettes au rétrécissement valvulaire, également appelées sténose, ayant pour conséquence l'obstruction du flux sanguin lors de la systole ventriculaire et de possible reflux sanguin intra-ventriculaire lors de la diastole ventriculaire. Cependant, la sténose pulmonaire est une pathologie qui touche plus particulièrement les enfants qui présentent une anomalie congénitale sur cette valve alors que la sténose aortique est une pathologie qui affecte plus particulièrement les populations âgées et qui, bien qu'elle puisse être induite par une anomalie congénitale de la valve, est surtout induite par un processus similaire à l'athérosclérose ou par une infection bactérienne (Helske, Kupari et al. 2007; Butcher, Mahler et al. 2011; Rigby 2012).



**Figure 2 : Représentation des valves cardiaques en coupe transversale.**

D'après le site de la *Valve Mitral Repair Center* de *The Mount Sinai Hospital*, New York [en ligne].

<http://www.mitralvalverepair.org/content/view/27/>

En ce qui concerne les valves auriculo-ventriculaires, elles sont, comme précédemment présentées, distinctes de la valve aortique par leurs localisations et donc leurs fonctions. En effet, chacune sépare une oreillette cardiaque du ventricule correspondant. Ainsi, la valve tricuspide empêche donc le reflux sanguin vers l'oreillette droite lors de la systole

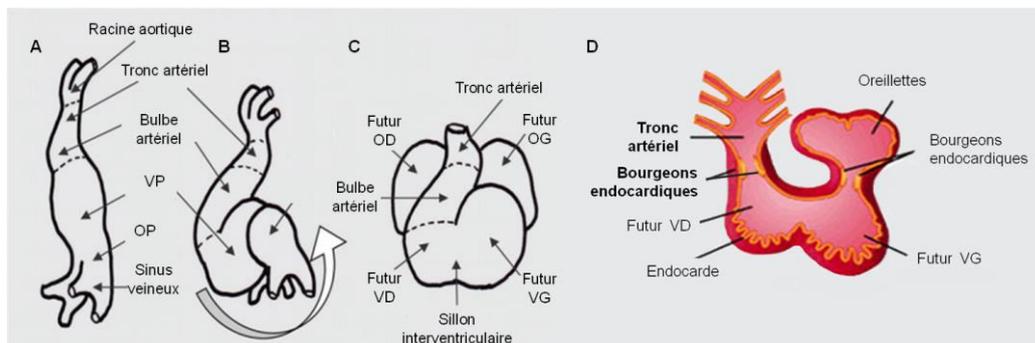
ventriculaire et la valve mitrale assure cette fonction pour le « cœur gauche ». La valve tricuspide, comme son nom l'indique, est constituée de 3 cuspides alors que la valve mitrale n'en possède que 2. De plus, les valves auriculo-ventriculaires présentent une structure anatomique sensiblement différente à la valve aortique par la présence de cordage tendineux et de muscles papillaires (**Figure 2**). Bien que le passage du sang de l'oreillette au ventricule soit passif grâce à un jeu de pression négative, la pression exercée sur le sang lors de la systole ventriculaire pourrait, si les valves auriculo-ventriculaires présentaient une structure anatomique similaire aux valves artérielles, permettre le reflux sanguin vers l'oreillette. C'est pour éviter ce phénomène que ces valves possèdent, au niveau de leurs faces ventriculaires, un réseau sophistiqué de cordage tendineux ancré au muscle ventriculaire par les muscles papillaires. En effet, grâce à leur contraction induite lors de la contraction du muscle ventriculaire, les muscles papillaires maintiennent les cuspides des valves fermées permettant au sang de rejoindre le réseau artériel (Misfeld and Sievers 2007). D'un point de vue pathologique, la valve tricuspide est la valve cardiaque la plus rarement touchée mais, comme la valve mitrale, elle peut être concernée par un problème d'insuffisance ou de sténose. Ainsi, l'insuffisance tricuspидique et mitrale se caractérise par une régurgitation du sang du ventricule vers l'oreillette lors de la systole ventriculaire. Cette insuffisance peut être dite fonctionnelle si consécutive à une dilatation du ventricule entraînant une dilatation de l'anneau fibreux sur lequel s'ancre les cuspides ou organique si elle est consécutive à une pathologie rhumatismale (pour les 2 valves) ou à une endocardite bactérienne ou dégénérescence myxoïde (pour la valve mitrale) ayant pour conséquence l'épaississement des cuspides et/ou l'allongement des cordages tendineux (Dreyfus, Martin et al. 2015; Levine, Hagege et al. 2015). Enfin, la sténose des valves auriculo-ventriculaires, caractérisée par une obstruction de passage du sang de l'oreillette vers le ventricule, est devenue rare dans les pays industrialisés car le plus souvent consécutive à une pathologie rhumatismale aiguë (Payvandi and Rigolin 2013).

### **3. Valvulogénèse.**

#### **3.1. Généralités.**

La valvulogénèse est le processus complexe au cours duquel se développent les cuspides entre la 5<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> semaine de développement embryonnaire (Butcher and Markwald 2007). Au 22<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire, le cœur a la forme d'un tube, appelé tube cardiaque primitif, qui présente les prémices des futures cavités cardiaques et son réseau

artério-veineux (**Figure 3A**). Sa paroi est composée d'un tube de cellules endocardiques au niveau de sa lumière et d'un tube myocardique au niveau distal ; ils sont séparés l'un de l'autre par une matrice extracellulaire (ECM, *extracellular matrix*) appelée gelée cardiaque. La première phase de la morphogenèse du cœur appelée plicature du tube cardiaque primitif est initiée à ce stade de l'embryogenèse (**Figure 3B**). Egalement appelé looping du tube cardiaque primitif en raison du mouvement de bascule initié par la croissance différentielle des sous-parties du tube cardiaque primitif, cette étape est également le point de départ de la valvulogenèse. En effet, alors que le cœur prend forme (**Figure 3C**), la gelée cardiaque régresse progressivement jusqu'à être présente exclusivement au niveau des zones de transition : d'une part, au niveau du futur septum interventriculaire et d'autre part, au niveau des bourgeons endocardiques. Egalement appelés bourrelets endocardiques, ces bourgeons sont les prémices des valves cardiaques ; ceux situés au niveau du sillon atrio-ventriculaire permettent la formation des valves auriculo-ventriculaires alors que ceux situés au niveau du bulbe artériel permettent la formation des valves artérielles (**Figure 3D**) (Bettex, Pretre et al. 2014).

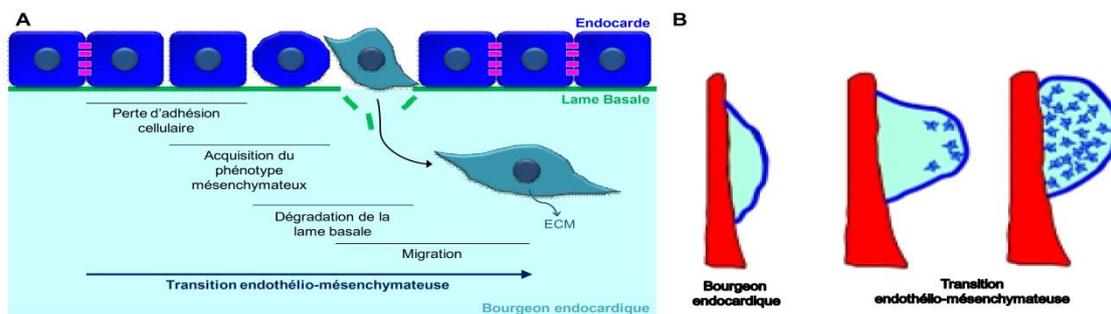


**Figure 3: Représentation de la morphogenèse cardiaque.** (A) : Tube cardiaque primitif. (B) : Plicature du tube cardiaque primitif. (C) : Vue frontale de la morphologie du cœur une fois la plicature achevée. (D) : Vue sagittale de la morphologie du cœur une fois la plicature achevée. Légende : VP : ventricules primitifs, OP : oreillettes primitives, OD : oreillette droite, OG : oreillette gauche, VD, ventricule droit et VG : ventricule gauche. D'après Olson 2004 et Bettex, Pretre et coll. 2014.

Bien que les phases précoces du développement des valves artérielles sont simultanées et identiques à celles des valves auriculo-ventriculaires, leurs développements tardifs différent puisque la formation tardive des valves auriculo-ventriculaires implique la construction de piliers tendineux dont les valves artérielles sont dépourvues (Butcher and Markwald 2007). De par ma thématique, j'aborderai ici uniquement la formation complète des valves artérielles.

Le développement de la valve aortique est obtenu par convergence et maturation des bourgeons endocardiques. Ce développement passe par 4 processus-clés : l'épaississement et la cellularisation, la différenciation cellulaire des cellules mésenchymateuses en cellules interstitielles de valves appelées plus communément VICs (*valvular interstitial cells*), l'excavation des cuspidés en formation et, enfin, la structuration de la matrice extracellulaire en 3 couches histologiques distinctes (Butcher and Markwald 2007; Combs and Yutzey 2009).

L'épaississement des bourgeons endocardiques fait suite à l'initiation de la transition endothélio-mésenchymateuse (EMT, *Endothelial Mesenchymal Transition*) des cellules endocardiques. Ce processus de différenciation cellulaire est induit par différents signaux émanant du myocarde et permet la cellularisation des bourgeons endocardiques par des cellules mésenchymateuses. En effet, la perte d'adhésion cellulaire de(s) cellule(s) endocardique(s) initie l'EMT puisque ces cellules acquièrent une adhésion nouvelle avec l'ECM du bourgeon endocardique et développe un phénotype mésenchymateux. Ces cellules migrent alors au sein du bourgeon après avoir dégradé la lame basale. Ayant rejoint le cœur du bourgeon endocardique, ces cellules s'allongent, gonflent et produisent davantage d'ECM (**Figure 4**) (Butcher and Markwald 2007; Combs and Yutzey 2009).

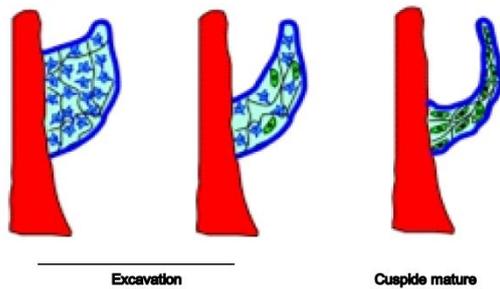


**Figure 4 : Etapes-clés de l'EMT (A) et développement précoce de la valve aortique (B).**

D'après Thiery and Sleeman 2006 et Butcher and Markwald 2007.

La différenciation cellulaire des cellules mésenchymateuses en VICs serait, comme démontré chez le zebrafish, induite par la plicature du cœur qui crée de nouvelles forces hémodynamiques appliquées sur la valve en formation. Néanmoins cela n'a jamais pu être mis en évidence dans d'autres modèles d'études tels que l'embryon de poulet ou de souris. Au cours de cette différenciation cellulaire, les cellules mésenchymateuses acquièrent un phénotype similaire aux myofibroblastes. Simultanément à cette phase de différenciation, l'excavation des cuspidés correspondant en un amincissement de celles-ci est induite par

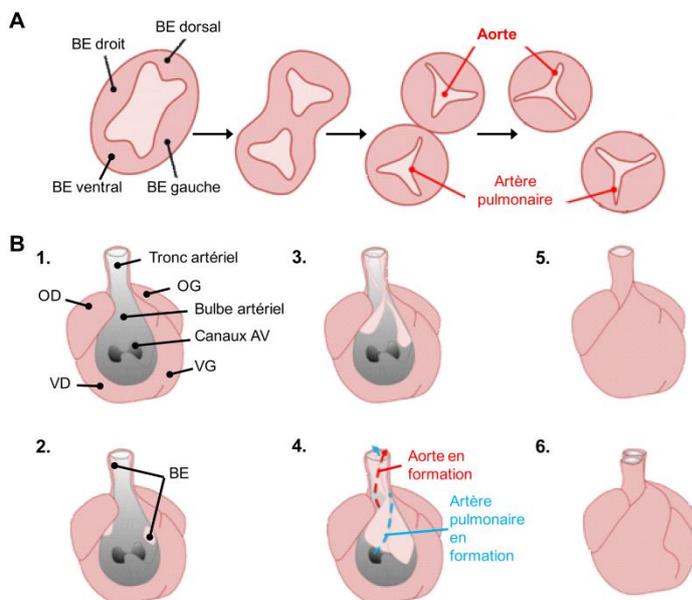
2 mécanismes distincts : l'apoptose et l'inhibition de la prolifération des cellules mésenchymateuses (**Figure 5**).



**Figure 5 : Développement tardif de la valve aortique.** Différenciation cellulaire des cellules mésenchymateuses (bleu) en VICs (vert) et excavation de la cuspide en devenir. D'après Butcher and Markwald 2007.

Enfin, l'organisation tissulaire des cuspides en maturation est effectuée par les VICs qui structurent l'ECM de la valve aortique en synthétisant du collagène, des protéoglycanes et de l'élastine. Ces éléments essentiels de l'ECM de la valve aortique mature permettent de mieux résister au flux sanguin et à ses diverses forces de cisaillement et de pression. Il s'agit de l'excavation des cuspides (**Figure 5**).

D'un point de vue interne, les cuspides sont ainsi achevées. Néanmoins, la valve aortique ne possède pas encore la morphologie anatomique qu'on lui connaît. En effet, cette valve acquiert sa morphologie suite au *wedging* (ou encastrement) de la voie efférente constituée du bulbe et du tronc artériel. Le *wedging*, simultané à la formation des cuspides, correspond à la mise en place d'un septum continu entre la future aorte et la future artère pulmonaire. Cette étape implique la formation simultanée de 3 septums : celui du bulbe artériel, celui dit aortico-pulmonaire et enfin, celui du tronc artériel. Le septum continu s'achève lorsque ces 3 septums se rencontrent et fusionnent. En raison du flux sanguin spiralé au travers de la voie efférente, la fusion des 3 septums provoque une rotation de 180° entre la base (bulbe artériel) et le haut (tronc artériel) de la voie efférente expliquant l'enroulement de l'aorte autour de l'artère pulmonaire (**Figure 6**) (Gittenberger-de Groot, Bartelings et al. 2005).



**Figure 6 : Etapes-clefs du *wedging* de la voie efférente en coupe transversale (A) et frontale (B).** Légende : BE : bourgeon endocardique, OD : oreillette droite, OG : oreillette gauche, VD : ventricule droit, VG : ventricule gauche, AV : atrio-ventriculaire. D'après les illustrations de l'UNSW embryology [en ligne] [https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Advanced\\_-\\_Outflow\\_Tract](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Advanced_-_Outflow_Tract).

La valve aortique dite tricuspide est ainsi formée. Néanmoins, 1 à 2 % de la population naît avec une valve aortique dite bicuspidie (congénitale ou de type 0) tandis qu'une partie de la population, extrêmement plus rare, présente une valve aortique unicuspidie ou quadricuspide. Ainsi, 657 cas d'unicuspidie de la valve aortique ont été rapportés dans la littérature scientifique comprises entre 1966 à 2008 dans le monde (Mookadam, Thota et al. 2010). Pour ce qui est de la quadricuspidie de la valve aortique, une étude menée sur une large cohorte (13 805 personnes) a conclu que cette anomalie concernait seulement 0,043 % de la population (Feldman, Khandheria et al. 1990).

Concernant la bicuspidie congénitale de la valve aortique, elle serait issue de la fusion des bourgeons endocardiques droit et gauche lors du *wedging* de la voie efférente. Cette fusion peut aussi être plus tardive dans le développement des cuspidés et impliquer les cuspidés droite et non-croisée. En ce qui concerne les autres anomalies congénitales de la valve aortique, les mécanismes impliqués sont encore non élucidés (Yuan and Jing 2010).

### **3.2. Mécanismes moléculaires.**

De nombreuses études portant sur les différentes étapes de la valvulogénèse ont été effectuées sur le zébrafish et les embryons de poulet et de souris. Le développement des cuspidés de la valve aortique implique pas moins d'une centaine de molécules dont j'aborderai, ici, les essentielles (Person, Klewer et al. 2005; Chakraborty, Combs et al. 2010; Townsend, Robinson et al. 2011).

### 3.2.1 Gonflement des bourgeons endocardiques et EMT.

Le gonflement des bourgeons endocardiques est induit par la sécrétion d'hyaluronan, polysaccharide appartenant à la famille des glycosaminoglycanes, par les cellules myocardiques. L'hyaluronan ainsi secrété s'ajoute à l'ECM de la gelée cardiaque résiduelle et « gonfle » les bourgeons endocardiques. Ce gonflement est également induit par l'invasion cellulaire des bourgeons initiée par le processus d'EMT (Butcher and Markwald 2007).

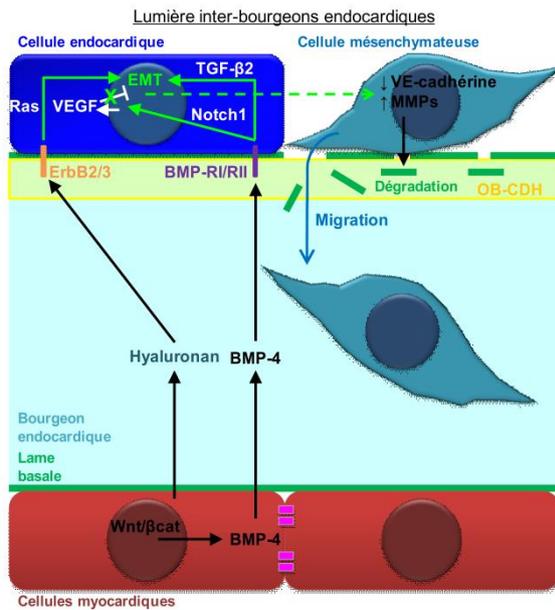
Quatre étapes-clefs définissent le processus d'EMT : la perte d'adhésion cellulaire, la perte de polarité cellulaire, la réorganisation du cytosquelette et l'invasion tissulaire par induction de la motilité cellulaire. Les mécanismes cellulaires impliqués dans ces étapes sont de plus en plus étudiés en raison de la réactivation de l'EMT dans le développement tumorale mais également en cas de lésion tissulaire et dans les processus de fibrose qui concernent tous deux la valve aortique adulte (Butcher and Markwald 2007).

Du point de vue de la valvulogénèse, l'EMT des cellules endocardiques des bourgeons est induite, d'une part, par la présence d'hyaluronan dans l'ECM mais également par la BMP-4 (*bone-morphogenetic protein-4*), facteur de croissance secrété au sein du bourgeon par les cellules myocardiques et régulé par la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (Wnt/ $\beta$ cat). Plus précisément, l'hyaluronan initie l'EMT en se liant aux récepteurs Erb (ErbB2/3) qui active la protéine Ras. Le BMP-4, quant à lui, initie l'EMT en se fixant au récepteur BMP-RI/RII des cellules endocardiques qui induit l'expression de Notch1 et de TGF- $\beta$ 2 (Luna-Zurita, Prados et al. 2010; Verhoeven, Haase et al. 2011). L'expression de Notch1 induit sélectivement la voie du TGF- $\beta$ 2 *via* le facteur de transcription snail et stimule l'EMT par inhibition de l'expression du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*).

Les cellules endocardiques initiées en EMT perdent tout d'abord leur adhésion suite à la désorganisation de toutes les jonctions cellulaires. Les protéines qui les constituaient telles que la claudine, l'occludine, la VE-cadhérine, les connexines, la desmogléine et la plakophiline sont relocalisées et/ou dégradées tandis que leurs expressions sont inhibées (Yilmaz and Christofori 2009). Consécutivement à la perte de ces jonctions cellulaire, ces cellules perdent ensuite leur polarité puisque les complexes de polarisation cellulaires Crumbs, PAR (pour *partitioning-defective* complexes) et SCRIB (pour *Scribble* complexes)

qui étaient associés aux jonctions cellulaires sont désorganisés (Huang, Guilford et al. 2012).

Les cellules endocardiques en EMT acquièrent alors un profil d'expression génétique nouveau, spécifique aux cellules mésenchymateuses et répriment le profil d'expression propre aux cellules endocardiques. La répression du profil génétique de cellule endocardique est médiée par l'activation de la voie Notch. Cette répression implique, entre autre, du VEGF mais également de la VE-cadhérine. L'acquisition du profil génétique de cellules mésenchymateuses est également induite par les voies de signalisation du TGF- $\beta$ 2. Elles impliquent la voie Akt qui induit l'expression de Snail *via* le NF $\kappa$ B. Ce facteur de transcription réprime l'expression des protéines impliquées dans les jonctions cellulaires et induit l'expression de protéines nécessaires à l'acquisition du phénotype mésenchymateux telles que les métalloprotéinases matricielles de type 2 (MMP-2, matrix metalloproteinase-2) et de type membranaire (MT-MMPs, membrane-type matrix metalloproteinases), la fibronectine ou encore, le collagène. De plus, elle réprime la *glycogen synthase kinase 3  $\beta$*  (GSK3 $\beta$ ) qui stabilisait la  $\beta$ -caténine. Libérée des jonctions cellulaires dans lesquelles elle était impliquée et plus dégradée par la GSK3 $\beta$ , la  $\beta$ -caténine peut alors migrer dans le noyau et agir comme co-activateur transcriptionnel des gènes appartenant au programme de l'EMT. Les voies de signalisation du TGF- $\beta$ 2 impliquent également la voie Ras qui contrôle l'expression de protéines impliquées dans le cytosquelette cellulaire. C'est cette voie qui permet à la cellule endocardique en EMT de former des prolongements cytoplasmiques que sont les lamellipodes et les filopodes et qui permettent la migration cellulaire car hautement impliqués dans la dégradation des éléments de l'ECM (Lamouille, Xu et al. 2014). En effet, la sécrétion de MMPs au niveau de ces prolongements clivent les liaisons peptidiques de protéines présentes au sein de la lame basale et de l'ECM du bourgeon endocardique et permettent la migration cellulaire au sein de la cuspside en formation. Cette migration est, comme récemment montré, régulée par l'OB-CDH (*osteoblast cadherin*, également appelé cadhérine 11), glycoprotéine membranaire impliquée dans l'adhésion de cellules ostéoblastiques à la matrice osseuse en formation (**Figure 7**) (Song, Jackson et al. 2000; Timmerman, Grego-Bessa et al. 2004; Shelton and Yutzey 2008).

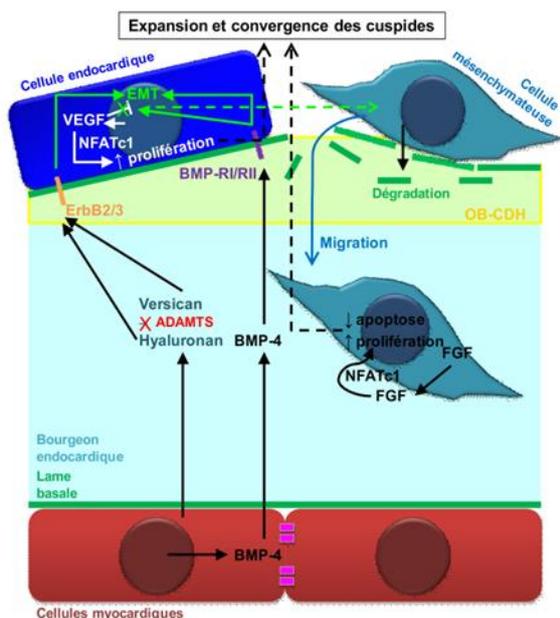


**Figure 7 : Régulation moléculaire de l'initiation de l'EMT.**

Via la voie Wnt/β-caténine, les cellules myocardiques secrètent du BMP-4 qui se fixe au récepteur BMP-RI/RII des cellules endocardiques. L'EMT est alors induite par la voie de signalisation du TGF-β2 et de Notch1 ainsi que par l'inhibition du VEGF. Induit par la liaison du récepteur ErbB2/3 avec l'hyaluronan, Ras initie l'EMT. Une cellule endocardique subissant l'EMT (flèche verte discontinue) réprime ses marqueurs endothéliaux tel que la VE-cadhérine et exprime des marqueurs mésenchymateux comme les MMPs. Par dégradation de la lame basale et des protéines de l'ECM, les MMPs permettent la migration cellulaire sous contrôle de l'OB-CDH. Légende : flèche noire et blanche: expression, sécrétion, liaison et initiation et flèche verte : activation de l'EMT. D'après Armstrong and Bischoff 2004 et Butcher and Markwald 2007.

### 3.2.2 Cellularisation et excavation des cuspides.

La cellularisation des cuspides en formation n'implique pas uniquement l'EMT mais également la prolifération des cellules mésenchymateuses et des cellules endocardiques qui évoluent en cellules endothéliales. En effet, sans prolifération des cellules endothéliales, l'expansion tissulaire des cuspides serait impossible. La prolifération de ces cellules impliquent 2 nouveaux acteurs : les facteurs de croissance FGF (*fibroblast growth factor*) et l'EGF (*epidermal growth factor*). Le FGF, secrété par les cellules mésenchymateuses, initie des voies de signalisation impliquées dans l'induction de la prolifération cellulaire et dans l'inhibition de l'apoptose. Les cellules mésenchymateuses prolifèrent ainsi massivement jusqu'à la phase d'amincissement de la cuspide. Les cellules endocardiques secrètent du VEGF qui induit leur propre prolifération et différenciation en cellules endothéliales. Dans les 2 cas, la prolifération est induite par le facteur de transcription NFATc1 et permet la convergence des cuspides en formation. L'EMT est aussi maintenue par le clivage du versican, protéoglycane fixée au hyaluronan, par des enzymes de la famille ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin MoTifs*) sécrétées par les cellules mésenchymateuses. Le versican induit l'EMT par la même voie de signalisation que l'hyaluronan (**Figure 8**) (Armstrong and Bischoff 2004; Butcher and Markwald 2007; Combs and Yutzey 2009).



**Figure 8 : Régulation moléculaire de l'expansion des cuspides.**

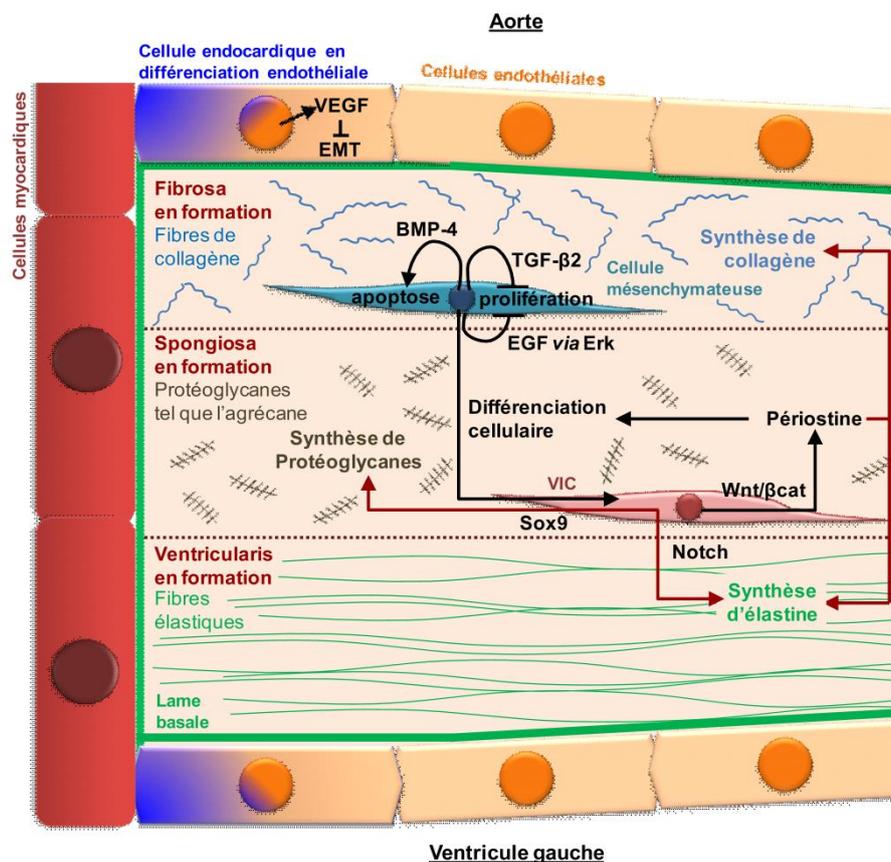
L'EMT est maintenue par les voies de signalisation précédemment citées et est renforcée par le clivage du versican et du hyaluronan, éléments de l'ECM du bourgeon endocardique, médié par les enzymes de la famille ADAMTS. L'expansion des cuspides est possible grâce à la prolifération des cellules endocardiques, médiée par le VEGF, et à la prolifération des cellules mésenchymateuses, médiée par le FGF qui inhibe également leur apoptose. Dans les 2 cas, la prolifération est induite par le NFATc1. Légende : flèche noire et blanche : expression, sécrétion, liaison et initiation, flèche verte : activation de l'EMT, flèche verte discontinue : EMT, flèche bleue : migration cellulaire et flèche noire discontinue : sens de l'expansion des cuspides. D'après Armstrong and Bischoff 2004 et Butcher and Markwald 2007.

### 3.2.3 Maturation des cuspides en formation.

Une fois la convergence atteinte, les cuspides s'amincissent suite à l'inhibition de la prolifération mésenchymateuse et à l'induction d'une importante apoptose cellulaire. L'inhibition de la prolifération mésenchymateuse est régulée par le TGF- $\beta$ 2 et par l'EGF *via* la voie de signalisation ERK. En effet, le TGF- $\beta$ 2 est une cytokine bivalente qui assure un équilibre prolifératif qui tend vers l'une ou l'autre fonction selon son environnement moléculaire. Le processus d'apoptose est induit par l'expression de BMP-4 par les cellules mésenchymateuses sans que le mécanisme précis ne soit encore élucidé (**Figure 9**) (Butcher and Markwald 2007; Combs and Yutzey 2009).

Enfin, la différenciation des cellules mésenchymateuses est intimement associée au remodelage et à la compartimentation de l'ECM en 3 couches distinctes. En effet, la périostine, protéine majeure du métabolisme de l'os, d'adhésion cellulaire et facteur de maturation, est essentielle à la compartimentation de l'ECM et à la différenciation myofibroblastique des cellules mésenchymateuses. Plus précisément, la compartimentation résulte de l'expression de certains facteurs de transcription. Ainsi, Notch est activé uniquement au niveau de la future ventricularis, couche histologique faisant face au ventricule tandis que Sox9 est exprimé au niveau de la future spongiosa, couche histologique intermédiaire, où il stimule l'expression de protéines matricielles dites « cartilagineuses » tel que l'agrécane. La structuration de la future fibrosa, couche histologique faisant face à l'aorte est, quant à elle, régulée par la voie de signalisation

Wnt/ $\beta$ cat qui induit l'expression de la périostine. Cette protéine est reconnue comme un important facteur de maturation puisqu'elle régule le remodelage de l'ECM par le contrôle de l'expression de collagène, d'élastine mais aussi des MMPs et leurs inhibiteurs *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs). De plus, elle supprime les phénotypes cellulaires non valvulaires par différenciation des cellules mésenchymateuses en VICs. Enfin, la périostine influence l'assemblage de l'ECM des cuspidés afin de leur conférer leurs structures trilamellaires. Parallèlement, il apparaît que l'OB-CDH jouerait lui-aussi un rôle de régulateur de l'homéostasie du tissu valvulaire en formation sans que les mécanismes précis soient à ce jour compris (**Figure 9**) (Lincoln, Kist et al. 2007; Snider, Hinton et al. 2008; Combs and Yutzey 2009; Bowen, Zhou et al. 2015).



**Figure 9 : Régulation moléculaire de la maturation des cuspidés.**

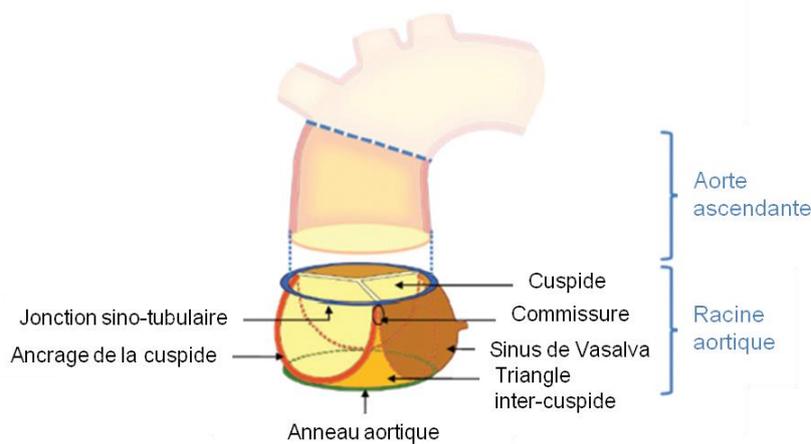
Cette étape implique 3 processus : l'amincissement, la compartimentation de la cuspidé en 3 couches distinctes (flèche bordeaux) et la différenciation des cellules mésenchymateuses en VICs. L'amincissement passe par l'inhibition de l'EMT médiée par le VEGF, par l'inhibition de la prolifération des cellules mésenchymateuses *via* le TGF- $\beta$ 2 et l'EGF et surtout par l'initiation de l'apoptose des cellules mésenchymateuses *via* BMP-4. Les VICs amplifient cette différenciation *via* la sécrétion de périostine induite par la voie Wnt/ $\beta$ cat. La périostine est impliquée dans la structuration trilamellaire de la valve puisqu'elle induit la synthèse et la structuration de fibres de collagène au sein de la fibrosa et de fibres élastiques au niveau de la ventricularis. La synthèse des fibres élastiques est amplifiée par l'expression localisée de Notch tandis que la synthèse des protéoglycanes est induite par l'expression localisée de Sox9. D'après Butcher and Markwald 2007 et Coomb and Yutzey 2009.

## 4. Physiologie de la valve aortique.

### 4.1. Généralités.

Sous l'effet de la pression du sang due à la contraction ventriculaire (systole ventriculaire), l'appareil valvulaire aortique s'ouvre passivement un peu plus de 100 000 fois par jour (Schoen 2008). Lors de la diastole ventriculaire, la colonne de sang envoyée dans l'aorte retombe sous l'effet de la gravité et referme ainsi passivement la valve aortique. Cet appareil et son bon fonctionnement sont indispensables pour assurer le transfert unidirectionnel du flux sanguin.

D'un point de vue anatomique, l'appareil valvulaire aortique fait partie intégrante de la racine aortique. Elle est constituée des 6 éléments suivants : les cuspidés, le site d'ancrage des cuspidés, les triangles inter-cuspidés, les sinus de Valsalva, la jonction sino-tubulaire et l'anneau aortique (Misfeld and Sievers 2007) (**Figure 10**).



**Figure 10 : Constitution anatomique de la valve aortique.**

D'après Charitos and Sievers 2013.

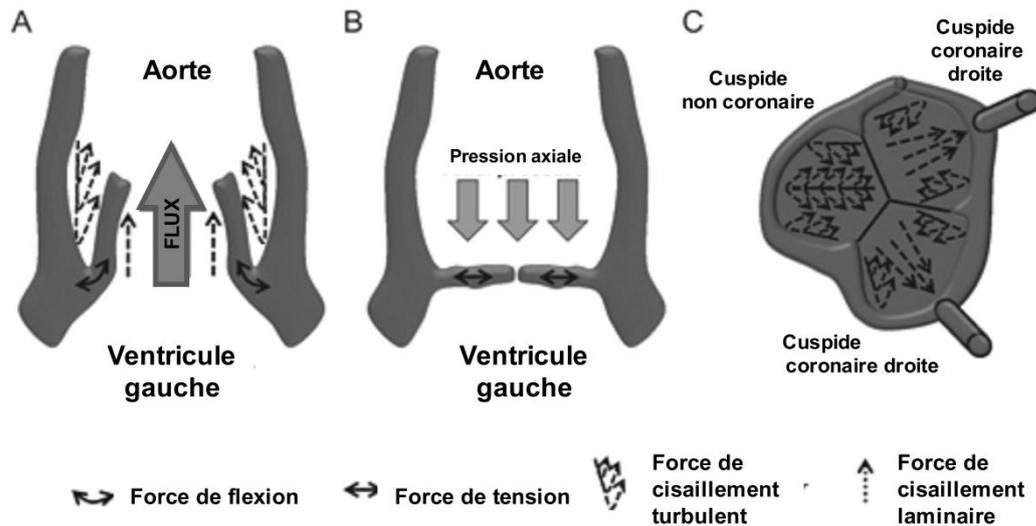
Plus précisément, les cuspidés sont physiologiquement présentes au nombre de 3. D'un point de vue anatomique, elles forment de fins feuillets semi-lunaires dont la base est implantée en forme de « U » sur la paroi aortique et dont le bord distal est libre. Frontière physique entre le ventricule gauche et l'aorte, elles forment une jonction hémodynamique puisqu'elles assurent le flux unidirectionnel du sang. Leur site d'ancrage, structure fibreuse épaisse, a une forme de couronne dont les 3 branches verticales remontent aux commissures des cuspidés. Sous ces commissures se trouvent les triangles inter-cuspidés qui, histologiquement, correspondent à une portion de la paroi aortique amincie et, du point de vue hémodynamique, à une extension de la voie d'éjection du ventricule gauche. Les sinus de Valsalva sont, quant à eux, des renflements de la racine aortique dont chacun fait face à

une cuspside. Deux de ces sinus servent d'ancrage aux artères coronaires droite et gauche permettant ainsi de distinguer chaque cuspside, nommées cuspside coronaire droite, gauche et non coronaire. Structure tubulaire constituée de la partie distale des sinus de Valsalva et des commissures, la jonction sino-tubulaire sépare la racine aortique de l'aorte ascendante. Enfin, bien que n'ayant pas d'identité anatomique ou histologique réelle, l'anneau aortique forme une structure circulaire virtuelle dont la circonférence est définie par le point d'ancrage le plus bas de chaque cuspside (Charitos and Sievers 2013).

#### **4.2. Environnement hémodynamique.**

De par sa situation anatomique, la valve aortique est soumise à de nombreuses forces, également appelées stress. C'est pour s'adapter à ces différentes forces qu'elle présente l'anatomie et l'histologie qu'on lui connaît.

Au cours du cycle cardiaque, la valve aortique subit 3 grandes forces qui apparaissent simultanément ou consécutivement. Ainsi, la flexion est la force soumise sur la valve lorsque que celle-ci s'ouvre et se ferme. Le cisaillement, également appelé shear stress soumet l'endothélium de la valve aortique au frottement répété des éléments figurés du sang. Elle apparaît lors de la systole pour la face ventriculaire et lors de la diastole pour la face aortique (Sacks, David Merryman et al. 2009). Cette force est sensiblement différente de part et d'autre de la valve aortique puisque, d'une part, la vitesse du sang est plus importante lors de la systole et, d'autre part, la direction du flux sanguin appliqué sur les faces est différente. Les forces de cisaillement sont plus importantes au niveau de l'endothélium de la face ventriculaire où le shear stress est laminaire contrairement à la face aortique où il est oscillatoire (Gould, Sriganapalan et al. 2013). Enfin la tension est une force interne à la valve aortique qui apparaît lors de la fermeture de la valve (**Figure 11**). La présence des coronaires au niveau des sinus de Valsalva perturbe le flux sanguin exercé sur les faces aortiques des cuspsides coronaires droites et gauches (Dweck, Boon et al. 2012). La présence de ce flux sanguin turbulent augmentant les forces de cisaillement appliquées sur les cuspsides coronaires ne les prédispose pas au développement de la sténose aortique (Sao). *A contrario*, la cuspside la plus concernée par le développement de la Sao est la cuspside non coronaire qui semble la moins adaptée aux perturbations du flux sanguin (Hinton and Yutzey 2011; Dweck, Boon et al. 2012; Otto 2015).



**Figure 11 : Répartition des forces subies par la valve aortique et induites par son environnement hémodynamique en coupe frontale lors de la systole ventriculaire (A) et de la diastole ventriculaire (B) et en coupe transversale lors de la diastole ventriculaire (C) D'après Back, Gasser et coll. 2013**

#### **4.3. Structure histologique.**

La structure histologique de la valve aortique est commune à l'ensemble des valves cardiaques. La valve aortique normale a une épaisseur inférieure à 1 mm et est, par conséquent, avascularisée. En effet, l'oxygénation des cellules, l'apport en nutriments et l'élimination des déchets cellulaires se font par diffusion au travers de l'endothélium (Schoen and Levy 1999). Ainsi chacune des cuspides est entièrement endothélialisée. Comme nous l'avons vu au niveau de la valvulogénèse, les cuspides possèdent une structure trilamellaire constituée de la ventricularis, de la spongiosa et de la fibrosa. C'est 3 couches sont, d'un point de vue histologique, distinctes puisque chacune d'elle possède une ECM spécifique. Il est à noter que chacun des éléments de l'ECM de la valve aortique joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie valvulaire par leurs propriétés mécaniques mais aussi par leurs nombreuses interactions avec les cellules de la valve aortique (Latif, Sarathchandra et al. 2005).

Composante cellulaire majeure de la valve aortique, les VICs sont présentes dans l'ensemble de ces 3 couches. La valve aortique possède un environnement hémodynamique particulier auquel elle doit s'adapter continuellement. C'est pourquoi elle a développé 2 voies de mécano-transduction : la voie centralisée et la voie décentralisée (Chan, Hinz et al. 2010). La voie centralisée a pour but de signaler et de réagir à des modifications des forces

externes à la valve. Ainsi, les interactions entre les cellules endothéliales valvulaires (VECs pour *Valvular Endothelial Cells*), les éléments de l'ECM et les VICs, assurées, entre autres, par les intégrines permettent de transmettre l'information et d'initier des voies de signalisation cellulaire précises pour réagir à cette modification de force (Latif, Sarathchandra et al. 2005; Chester, El-Hamamsy et al. 2014). La voie décentralisée a, quant à elle, pour fonction de réagir rapidement à toutes modifications de force détectées en interne. Ainsi, les nombreuses interactions intercellulaires et inter cellules-ECM exercent des contraintes sur ces cellules qui détectent et mesurent les forces de contraction et de tension exercées au sein de la valve. Lorsque ces forces viennent à être modifiées, cela entraîne une déformation cytoplasmique qui perturbent les liaisons existantes entre le noyau de la cellule et son cytoplasme ayant pour conséquence un rapide changement de son profil d'expression (Latif, Sarathchandra et al. 2005; Chester, El-Hamamsy et al. 2014).

#### **4.3.1 L'endothélium.**

Constitué de VECs, l'endothélium constitue une surface de contact non-thrombotique avec le sang (**Figure 12**) (Butcher, Mahler et al. 2011). Contrairement à l'endothélium des vaisseaux sanguins, l'endothélium de la valve est orienté perpendiculairement au flux sanguin. Il est par conséquent soumis à des forces de cisaillement et de pression similaire à celles observées aux différentes bifurcations du système vasculaire. L'endothélium de la face ventriculaire présente des particularités différentes de celui qui constitue la face aortique comme cela sera évoqué dans un prochain paragraphe (Latif, Sarathchandra et al. 2005).

#### **4.3.2 La ventricularis.**

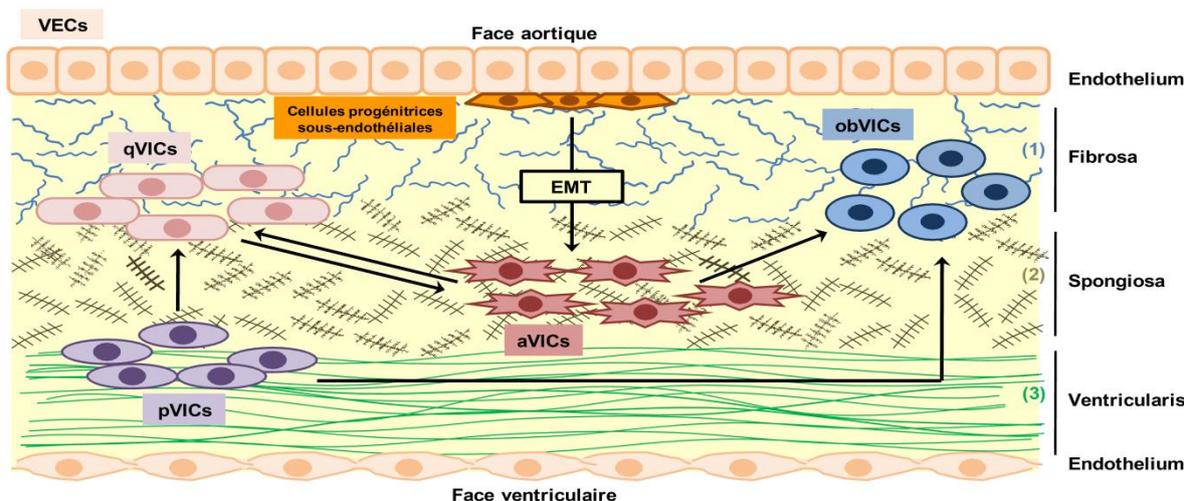
Face au ventricule et représentant entre 20 % et 30 % de l'épaisseur de la valve aortique normale, la ventricularis est une couche constituée de fibres de collagène de type I, III et IV, de protéoglycanes, de fibronectine et surtout de fibres élastiques entrelacées et disposées en direction radiale (**Figure 12**) (Latif, Sarathchandra et al. 2005). Ces fibres possèdent une forte résistance aux déformations tissulaires répétées permettant le maintien de l'architecture de la valve au cours du cycle cardiaque. En effet, la forte flexibilité des fibres élastiques et leur disposition au sein de la ventricularis permettent de supporter le shear stress unidirectionnel, pulsatile et rapide subit par cette couche (Butcher, Mahler et al. 2011).

### 4.3.3 La spongiosa.

Couche intermédiaire de la valve aortique, la spongiosa représente entre 29 et 35 % de l'épaisseur de la valve aortique normale (**Figure 12**). Elle est constituée de fibres de collagène de type I et III, de fibronectine et surtout de glycosaminoglycanes (GAGs) et protéoglycanes (Latif, Sarathchandra et al. 2005). L'acide hyaluronique représente la majorité des GAGs et protéoglycanes présentes au sein de la valve et représente 60 % du contenu de la spongiosa. Les chondroïtines 4 et 6 sulfates représentent, quant à elles, 30 % de ce contenu contre 10 % pour la décorine. Dans une moindre mesure, elle contient également du versicane et des biglycanes (Latif, Sarathchandra et al. 2005; Grande-Allen, Osman et al. 2007). Par les interactions entre les fibres de collagène, les GAGs et les protéoglycanes, cette couche possède des propriétés élastiques et une résistance accrue aux pressions comme celles exercées sur la valve lors de la systole ventriculaire. En effet, par les charges négatives de leurs chaînes latérales, les protéoglycanes agissent comme des pièges à eau capables d'absorber les contraintes liées aux forces de pression tels des amortisseurs. Les protéoglycanes de la spongiosa sont également en interaction avec les VICs (Butcher, Mahler et al. 2011).

### 4.3.4 La fibrosa

Face à l'aorte et représentant entre 41 et 45 % de l'épaisseur de la valve aortique normale, la fibrosa est constituée de fibronectine et de très nombreuses fibres de collagène dont la direction est circonférentielle (**Figure 12**). Ces fibres de collagène sont essentiellement de type I mais également de type III et, dans une faible mesure, de type V (Latif, Sarathchandra et al. 2005). Elles confèrent à la valve aortique une résistance mécanique accrue permettant de considérer la fibrosa comme la colonne vertébrale de la valve puisqu'elle permet le maintien de son intégrité tissulaire. Cette couche présente ainsi une rigidité plus forte que celle présentée par la ventricularis alors que le shear stress qu'elle subit est moindre. En effet, lorsque la colonne de sang retombe sur la valve aortique lors de la diastole, elle crée un shear stress oscillatoire qui nécessite, pour y résister efficacement, une plus grande rigidité (Butcher, Mahler et al. 2011).



**Figure 12 : Représentation schématique de la structure histologique de la valve aortique et de ses composantes cellulaires.**

Entièrement endothélialisée, la valve aortique est constituée de trois couches histologiquement distinctes : la fibrosa constituée essentiellement en fibres de collagène (1), la spongiosa riche en GAGs (2) et la ventricularis constituée essentiellement de fibres élastiques (3). Composante cellulaire principale de la valve aortique, les VICs sont présentes dans ces 3 couches. Légende : EMT : endothelial mesenchymal transition, VECs : valvular endothelial cells, aVICs, activated VICs, obVICs : osteoblastic VICs, pVICs : progenitor VICs et qVICs : quiescent VICs. Les flèches indiquent les différenciations possibles. Adaptée de Liu, Joag et coll. 2007

#### **4.4. Composantes cellulaires**

Bien que chacune des composantes cellulaires de la valve aortique est présentée séparément, les interactions entre elles sont très importantes pour le maintien de l'homéostasie valvulaire (Butcher, Mahler et al. 2011). En effet, il a été montré en culture *in vitro* que le comportement des VICs en présence des VECs est sensiblement différent à celui que les VICs présentent lorsqu'elles sont cultivées seules. Ainsi, la présence des VECs stabilise la prolifération des VICs, permet de les maintenir en quiescence, augmente leur synthèse protéique et diminue la perte de synthèse des GAGs (Rothenburger, Volker et al. 2002; Butcher and Nerem 2006).

##### **4.4.1 Les cellules endothéliales valvulaires (VECs).**

Comme présenté précédemment, les VECs disposées perpendiculairement par rapport au flux sanguin, sont soumises aux forces appliquées par celui-ci, ce qui nécessite de nombreuses adaptations. Il y a tout d'abord une réorganisation de leur cytosquelette entraînant une adhésion focale particulière avec les éléments de l'ECM sous-jacent (Butcher, Penrod et al. 2004). De plus, leur profil d'expression génétique est sensiblement différent

puisque ces cellules expriment davantage de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire chondrogénique et ostéogénique comme la périostine et l'OB-CDH (Butcher, Tressel et al. 2006).

Comme nous l'avons vu, les forces hémodynamiques appliquées sur l'endothélium de la face ventriculaire sont différentes de celles subies par l'endothélium de la face aortique. Les VECs de ces 2 endothéliums présentent un profil cellulaire spécifique et adapté aux forces auxquelles elles devront résister. Ainsi, les VECs présents au sein de l'endothélium face au ventricule sont allongés (**Figure 12**) et expriment de nombreux gènes impliqués dans l'inhibition de la calcification mais également des prostacyclines, le facteur von Willebrand, des caspases 3, le TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ), le NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*), récepteur PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ) (Bischoff and Aikawa 2011; Butcher, Mahler et al. 2011). Les VECs présentes au sein de l'endothélium faisant face à l'aorte possèdent une forme cuboïde (**Figure 12**) et expriment davantage de gènes dit antioxydants codant pour des enzymes anti-oxydatives comme la glutathion S-transférase microsomale 2 (MSGT2, *Microsomal glutathione S-transferase 2*), la peroxyredoxine 2 et l'eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*). *A contrario*, l'expression de protéines impliquées dans le stress oxydatif comme le récepteur 1 des LDLs oxydés (LOX1, *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*) et la 12-lipoxygénase est réduite. Par conséquent, les VECs de la face aortique maintiennent fortement l'état anti-oxydatif ce qui inhibe l'expression de transcripts pro-inflammatoires (Simmons, Grant et al. 2005; Bischoff and Aikawa 2011). Néanmoins, en cas de lésion endothéliale, les VECs des 2 endothéliums augmentent rapidement l'expression de récepteurs inflammatoires tels que VCAM-1 et ICAM-1 et expriment les protéines BMP-2 et -4. Leurs capacités prolifératives plus importantes que celle des cellules endothéliales vasculaires, leur permettent de refermer rapidement une lésion endothéliale (Farivar, Cohn et al. 2003; Butcher, Mahler et al. 2011).

#### 4.4.2 Les cellules périvasculaires.

Contenues au sein de l'endothélium valvulaire, ces cellules présentent une haute plasticité et peuvent réactiver, en cas de lésion endothéliale, le processus d'EMT (**Figure 12**) (Bischoff and Aikawa 2011). En effet, l'inflammation valvulaire consécutive à la lésion implique une présence significative de l'interleukine 6 (IL6), cytokine inflammatoire capable de promouvoir l'EMT (Mahler, Farrar et al. 2013). Ces cellules permettraient ainsi de réparer plus rapidement la lésion tissulaire puisque leur différenciation renforcerait le

pool cellulaire de VICs activées (aVICs, *activated Valvular Interstitial Cells*). Il a été démontré que ces cellules sont également capables d'acquérir le phénotype de VICs ostéoblastiques (obVICs, *osteoblastic VICs*) au cours de leurs différenciations (Bischoff and Aikawa 2011).

#### **4.4.3 Les cellules interstitielles de valve (VICs).**

Principale composante cellulaire des valves cardiaques, les VICs sont essentielles au maintien de l'homéostasie valvulaire car elles assurent le turn-over constant de l'ECM essentiel pour résister aux différentes forces subies par la valve. Avec 4 phénotypes distincts au sein de la valve aortique mature, les VICs constituent une famille cellulaire hétérogène (**Figure 12**). (Stout and Otto 2007)

##### **(a) Les VICs progénitrices (pVICs).**

Les VICs progénitrices (pVICs, *progenitor Valvular Interstitial Cells*) sont de 2 types : (1) celles naturellement présentes au sein de la valve appelées pVICs résidentes, (2) celles issues de la moëlle osseuse, recrutées au sein de la valve *via* la circulation sanguine, appelées pVICs hématopoïétiques (Liu, Joag et al. 2007). Les pVICs résidentes auraient pour fonction le renouvellement cellulaire du tissu valvulaire par différenciation en qVICs. Les pVICs hématopoïétiques, recrutées *via* les facteurs de l'inflammation peuvent se différencier en aVICs dans le but d'augmenter leur pool cellulaire afin d'accélérer la réparation tissulaire. Ainsi, il a été montré dans un modèle murin de Sao que près de 10% des aVICs présentes sont issues de la différenciation de pVICs hématopoïétiques (Visconti, Ebihara et al. 2006). Cependant, ces cellules sont également capables de se différencier en obVICs et peuvent donc contribuer à la calcification de la valve aortique (Leskela, Satta et al. 2006; Chen, Yip et al. 2009; Hajdu, Romeo et al. 2011).

##### **(b) Les VICs quiescentes (qVICs).**

Prédominante au sein de la valve aortique normale, les qVICs ont pour rôle de préserver l'homéostasie tissulaire par le renouvellement continu de l'ECM (Aikawa, Whittaker et al. 2006). Elles sont ainsi capables de sécréter ses différents constituants tels que les chondroïtines sulfates et la fibronectine mais aussi de dégrader progressivement ces éléments afin que l'intégrité tissulaire de la valve soit toujours la plus optimale pour remplir sa fonction (Latif, Sarathchandra et al. 2005). Les qVICs présentent un très faible pouvoir

prolifératif (Aikawa, Whittaker et al. 2006). Cette sous-population est encore peu connue car difficile à étudier. En effet, il a été rapporté que les qVICs s'activaient spontanément au cours de leur culture primaire (Taylor, Allen et al. 2000; Pho, Lee et al. 2008).

### (c) Les VICs activées (aVICs).

Peu présentes au sein des valves aortiques normales où elles sont alors essentiellement localisées au niveau de la fibrosa, les aVICs abondent en cas de lésions valvulaires où elles agissent pour une réparation efficace et rapide du tissu valvulaire. Ces cellules aux caractéristiques myofibroblastiques sont en fait issues de l'activation des qVICs. En effet, lorsque la valve est endommagée, les cellules endothéliales concernées libèrent différents médiateurs tels que le NO, l'endothéline mais aussi des cytokines inflammatoires comme le TGF- $\beta$ 1, le TNF $\alpha$  et l'interleukine 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) (Ngo, Sverdlov et al. 2012). Ces médiateurs initient le basculement phénotypique des qVICs en aVICs en amplifiant l'expression de l' $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA), de la smooth muscle myosin (SMM), de MMPs et de cathepsines (Rabkin-Aikawa, Farber et al. 2004). De plus, les qVICs détectent les forces appliquées au sein et à la surface de la valve aortique. Une modification de celles-ci peut, par les voies de mécano-transduction, activer les qVICs en aVICs. Ces VICs prolifèrent alors davantage. Elles sont capables de migrer jusqu'au site de la lésion où elles exercent une force de traction plus importante sur les éléments de l'ECM. Elles produisent des enzymes de dégradation de l'ECM mais conservent tout de même leur capacité à synthétiser ses différents constituants (Butcher, Mahler et al. 2011). Lorsque la réparation est achevée, les aVICs entrent généralement en apoptose afin de ne pas perturber l'homéostasie valvulaire par un remaniement inopportun de l'ECM (Desmouliere and Gabbiani 1995). Cependant, 30 % des cellules présentes au sein des valves aortiques sclérosées sont des aVICs (Taylor, Allen et al. 2000; Rabkin-Aikawa, Farber et al. 2004). Elles semblent donc être fortement impliquées dans le développement de la Sao puisque, si elles échappent au processus de mort cellulaire, l'accumulation progressive des aVICs due à leur forte prolifération induit un bouleversement de l'homéostasie valvulaire créant un environnement pro-fibrotique et pro-ostéogénique (Desmouliere 1995). La fibrose et la calcification progressive créent un cercle vicieux car la rigidification de la valve augmente la tension exercée sur les qVICs ayant pour conséquence leur activation par stimulation biomécanique (Yip and Simmons 2011).

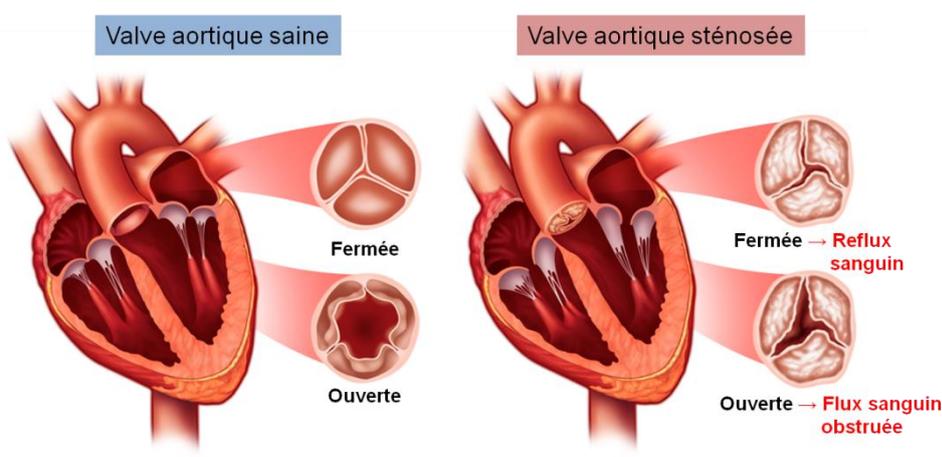
#### (d) Les VICs ostéoblastiques (obVICs).

La différenciation des aVICs en obVICs est induite *via* la  $\beta$ -caténine, protéine d'adhésion intercellulaire associée à un microfilament d'actine en interaction avec l'OB-CDH. La surexpression de cette cadhérine s'avère révélatrice d'une différenciation ostéoblastique puisque l'activation des récepteurs TLR (*tool-like receptor*) et FZD (*frizzled*) inhibe la dégradation de la  $\beta$ -caténine qui, libérée de ses interactions, migrent jusqu'au noyau pour agir comme coactivateur de la voie de signalisation Wnt, impliquée dans la différenciation ostéoblastique (Li, Xu et al. 2013). La dégradation progressive des fibres élastiques, principalement par les MMP-12, a pour conséquence la présence de peptides élastines capables d'induire la différenciation chondrogénique des aVICs (Perrotta, Russo et al. 2011).

## II. La sténose aortique.

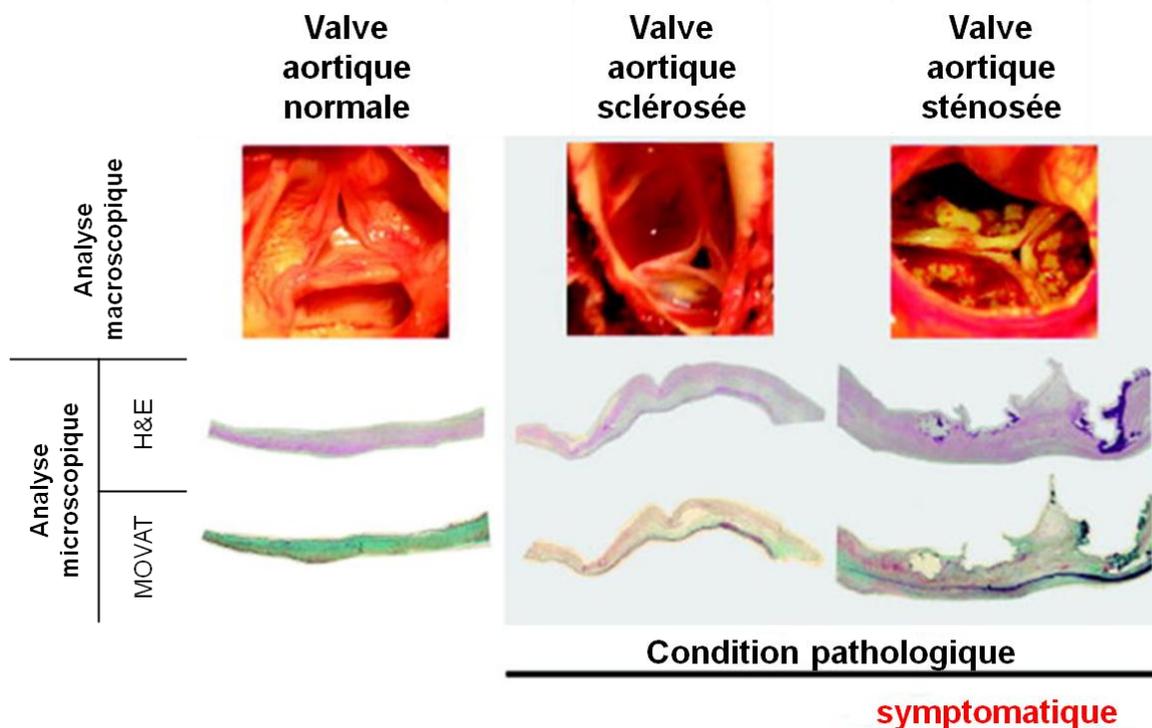
### 1. Généralités.

Issue du grec *stenosis* signifiant « rétrécissement », la Sao se définit comme étant le rétrécissement de la surface fonctionnelle de la valve aortique ayant pour conséquences une capacité réduite à s'ouvrir et une fermeture incomplète. Cette pathologie est d'autant plus sévère que cette surface se rétrécit. La valve aortique ne peut alors plus assurer le flux unidirectionnel du sang puisque la valve rigidifiée obstrue le flux sanguin lors de la systole et sa fermeture incomplète permet le reflux sanguin dans le ventricule gauche lors de la diastole (**Figure 13**). Bien qu'en France, on parlera plus volontiers de rétrécissement aortique (Rao), le terme de sténose aortique, *aortic stenosis* en anglais, est plus communément utilisé dans les publications internationales.



**Figure 13 : La valve aortique saine et sténosée.** Coupe cardiaque en vue sagittale et coupe valvulaire en vue transversale. D'après l'illustration de la *New Heart Valve* [en ligne] <http://newheartvalve.com/hcp/about-aortic-stenosis>

D'un point de vue physiopathologique, la Sao était, jusqu'en 2001, définie comme un processus de dégénérescence passif de la valve aortique. Il est néanmoins désormais acquis que la Sao est une pathologie dite « *atherosclerosis-like* » car sa physiopathologie est fortement similaire à celle de l'athérosclérose avec 4 processus initiés : l'inflammation, la fibrose, la néo-angiogenèse et la calcification (Pohle, Maffert et al. 2001). Il s'agit donc d'une pathologie progressive caractérisée par une longue phase de latence appelée sclérose aortique. Issu du grec *sklêros* signifiant dur, la phase de sclérose consiste en un épaissement progressif de la valve aortique conduisant à sa rigidification et, progressivement, à la réduction de sa surface fonctionnelle. Cette phase de latence est très souvent asymptomatique car ayant peu d'impact sur le flux sanguin (**Figure 14**). Néanmoins, comme Nightingale et coll. concluaient en 2005, la sclérose aortique n'est pas un innocent murmure mais un marqueur de risque cardiovasculaire accru puisque le risque d'infarctus du myocarde dans les 5 ans est de 50 % (Nightingale and Horowitz 2005). La Sao proprement dite est initiée lorsque la valve aortique s'avère incapable de remplir son rôle et ce, par l'initiation des 4 processus athéroscléreux.



**Figure 14 : Analyse macroscopique et microscopique de la valve aortique normale, sclérosée et sténosée.**  
Analyse macroscopique : photographies intra-opératoires assistées par vidéoscopie. Analyses microscopiques : H&E : coloration histologique à l'hématoxyline (noyau en bleu) et éosine (cytoplasme en rouge et collagène en rose). La coloration MOVAT permet de mettre en évidence les noyaux et les fibres élastiques en noir, les fibres de collagène en jaune, les polysaccharides en bleu/vert et la fibrine en rouge. D'après Grau, Poggio et al. 2012.

Il existe 4 stades distincts de la pathologie, établis sur des critères cliniques et définis comme suit (Stout and Otto 2007; Otto 2015):

- le stade A correspondant à la sclérose aortique, précurseur asymptomatique de la Sao, ou à la bicuspidie aortique,
- le stade B, progression légère à modérée de la sténose,
- le stade C, Sao sévère mais néanmoins asymptomatique et
- le stade D, Sao sévère et symptomatique. Ce stade présente 3 sous-catégories :
  - o le stade D1 présente un haut gradient transvalvulaire (supérieur à 40 mm Hg),
  - o le stade D2 présente un gradient transvalvulaire bas (inférieur à 40 mm Hg) et une fraction d'éjection ventriculaire inférieure à 50 % et
  - o le stade D3 présente un gradient transvalvulaire bas avec une fraction d'éjection ventriculaire normale.

### **1.1. Prévalence.**

Dans les pays développés, la Sao est, en terme de fréquence, la 3<sup>ème</sup> cardiopathie juste derrière la coronaropathie et l'hypertension artérielle (Pibarot and Dumesnil 2007). La sclérose aortique touche 25 % de la population de plus de 65 ans alors que la Sao concerne 2 % de cette même population (Stewart, Siscovick et al. 1997; Agmon, Khandheria et al. 2001). L'impact sur le système de santé est, par conséquent, important puisque le remplacement valvulaire, seul traitement efficace à ce jour de la Sao, représente la seconde indication de chirurgie cardiaque (Roberts and Ko 2005). En raison du vieillissement global de la population, la prévalence de cette pathologie ne va pas cesser de croître dans les prochaines années. En effet, comme l'étude AGES–Reykjavík le démontre sur la population islandaise, l'augmentation de l'espérance de vie va accroître sensiblement la population âgée de plus de 70 ans. Ils ont ainsi estimé qu'actuellement, 1230 personnes de plus de 70 ans présentaient une Sao sévère contre 2989 en 2040 et 3954 en 2060. Le vieillissement de la population dans les pays industrialisés et la fréquence de Sao étant similaire à celle de l'Islande, on peut donc estimer que les cas de Sao tripleront d'ici à 2060 pour les personnes âgées de plus de 70 ans (Danielsen, Aspelund et al. 2014).

## **1.2. Etiologie**

Autrefois considérée comme issue d'un processus passif de dégénérescence tissulaire, la Sao est désormais considérée comme issue d'un processus actif induit soit par une maladie valvulaire aortique soit par un processus dit athéroscléreux. (Stout and Otto 2007).

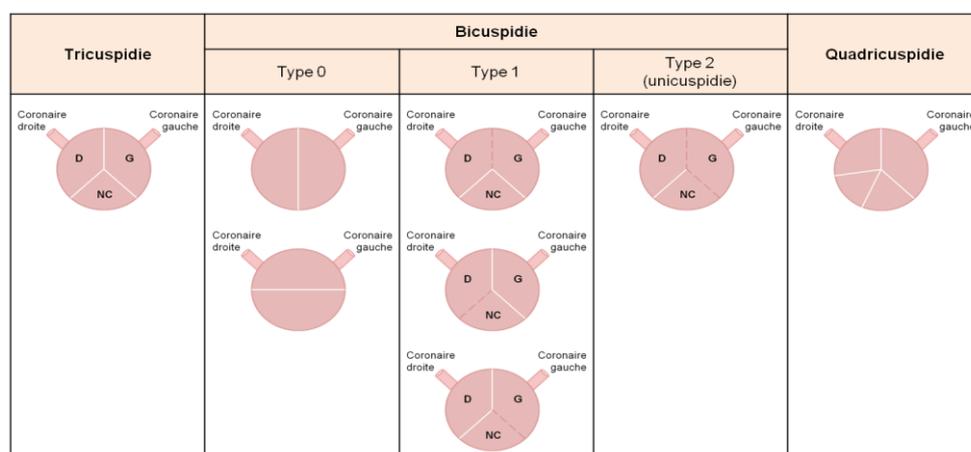
Les maladies valvulaires aortiques capables d'induire la Sao sont de 2 types : il y a, d'une part, les anomalies structurelles congénitales qui sont des facteurs de risque de Sao et, d'autre part, les maladies infectieuses telles que la fièvre rhumatismale et l'endocardite infectieuse (Thaden, Nkomo et al. 2014). En effet, les anomalies structurelles congénitales telles que la bicuspidie aortique ou l'unicuspidie aortique créent un environnement hémodynamique défavorable à l'homéostasie valvulaire. Bien que la Sao induite par une maladie infectieuse et la Sao issue d'un processus athéroscléreux présentent des mécanismes physiopathologiques fortement similaires, elles se distinguent l'une de l'autre par leurs causes intrinsèques. Ainsi, les maladies infectieuses induisent la Sao par la présence d'une infection bactérienne qui envahit la valve aortique, initie une réaction inflammatoire et une dégradation de l'ECM. Dans certains cas, la formation de végétations bactériennes initie la formation d'un raphé entre 2 cuspidés (fausse bicuspidie). Si l'infection bactérienne est traitée avant qu'elle n'atteigne la valve aortique, le développement de la Sao est enrayé ; ce qui explique pourquoi ces maladies infectieuses restent la première cause de Sao au sein des pays en voie de développement (Veinot 2006; Wilson, Taubert et al. 2007). La Sao issue d'un processus athéroscléreux est, quant à elle, induite par l'infiltration de cholestérol et de lipoprotéines au sein du tissu valvulaire et se distingue de l'athérosclérose par la présence accrue de calcifications. Je développerai sur la Sao issue d'un processus athéroscléreux qui constitue la 1<sup>ère</sup> cause de Sao au sein des pays industrialisés (Helske, Kupari et al. 2007; Butcher, Mahler et al. 2011)

## **1.3. Facteurs de risque.**

La Sao issue d'un processus athéroscléreux présente de nombreux facteurs de risque communs à l'athérosclérose : l'âge, le sexe, l'hypertension artérielle, le syndrome métabolique, l'hyperlipidémie, l'hypercholestérolémie, le diabète et le tabac (Helske, Kupari et al. 2007; Stout and Otto 2007). Il existe 3 grandes catégories de facteurs de risque : les anomalies structurelles, les facteurs de risque génétique et les facteurs de risque acquis.

### 1.3.1 Anomalies structurelles.

Comme nous l'avons vu au niveau de la valvulogénèse, la valve aortique est normalement constituée de 3 cuspidés. Néanmoins, elle peut être constituée de seulement 2 sigmoïdes symétriques. Cette bicuspidie congénitale dite de type 0 constitue la plus fréquente des malformations cardiaques congénitales puisqu'elle concerne de 1 à 2 % de la population. Cette proportion est néanmoins bien souvent sous-estimée car il existe des cas de « fausse » bicuspidie aortique et la distinction entre les 2 n'est pas aisée lorsque la valve est déjà calcifiée. Les « fausses » bicuspidies, dite de type 1, sont consécutives à la formation d'un raphé, ligne de fusion tissulaire, entre 2 cuspidés de la valve aortique (**Figure 15**). Ce raphé est formé lors d'un rhumatisme articulaire aigu ou suite à une endocardite infectieuse. Les cuspidés coronaires sont celles qui ont le plus tendance à fusionner avec 71 % des cas de « fausses » bicuspidies (Sievers and Schmidtke 2007). Enfin, bien que très rares, il existe 2 formes extrêmes de valve aortique : l'unicuspidie (appelée également bicuspidie de type 2) issue de la formation d'un second raphé ou congénitale et la quadricuspidie qui est congénitale et dont les mécanismes sont encore indéterminés (**Figure 15**) (Timperley, Milner et al. 2002; Sievers and Schmidtke 2007).



**Figure 15 :**  
**Classification morphologique de la valve aortique.**

Légende : D : cuspidé coronaire droite, G : cuspidé coronaire gauche, NC : cuspidé non coronaire, trait continu blanc : commissure et trait discontinu rose : raphé. D'après Sievers and Schmidtke 2007.

La bicuspidie et l'unicuspidie aortique représentent des facteurs de risque important de Sao. En effet, les anomalies structurelles de la valve aortique semblent accélérer le développement de la Sao par l'induction d'un environnement hémodynamique très défavorable, à l'homéostasie valvulaire. Ainsi, la bicuspidie aortique représente 60 % des procédures de remplacements valvulaires chez les patients dont l'âge est compris entre 40 et 70 ans alors qu'elle ne représente plus que 40 % chez ceux dont l'âge est supérieur à 70 ans

(Roberts and Ko 2005). Bien que rare, l'unicuspidie aortique est un facteur de risque élevé puisque les porteurs de cette anomalie subissent un remplacement valvulaire durant leur enfance ou leurs adolescence. Cette anomalie constitue la principale cause de Sao fatale dans la population pédiatrique (Thaden, Nkomo et al. 2014).

### **1.3.2 Facteurs de risques génétiques.**

De nombreux facteurs de risques génétiques prédisposent plus ou moins fortement au développement de la Sao, le premier d'entre eux étant le sexe. En effet, comme pour les autres pathologies cardiovasculaires, les femmes sont protégées par la présence d'œstrogènes dans leur organisme jusqu'à leur ménopause et sont donc touchées plus tardivement que les hommes.

Parmi les autres facteurs de risque génétique, on retrouve des anomalies génétiques prédisposant, d'une part, à l'acquisition d'une anomalie structurelle de la valve aortique telle que la bicuspidie aortique et, d'autre part, à une modification structurelle et fonctionnelle de la valve aortique et impliquant un gène jouant un rôle soit dans la synthèse d'un élément de l'ECM comme l'élastine (Hinton, Adelman-Brown et al. 2010) ou le collagène (Wong, Follis et al. 1995; Malfait, Symoens et al. 2006), soit dans le métabolisme du calcium (Strickberger, Schulman et al. 1987) et des lipides (Bella, Tang et al. 2007; Thanassoulis, Campbell et al. 2013).

Il semblerait que la bicuspidie aortique congénitale puisse être issue d'une anomalie génétique qui toucherait le gène impliqué soit dans la synthèse de l'*endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) soit dans la synthèse du récepteur NOTCH1. En effet, les patients atteints de bicuspidie aortique expriment moins d'eNOS au niveau de l'endothélium valvulaire (Aicher, Urbich et al. 2007). Quant à NOTCH1, il existe une corrélation positive entre la mutation de NOTCH1, la bicuspidie aortique et la Sao sévère. De plus, l'endothélium valvulaire de patients bicuspidiques expriment moins de NOTCH1 que celui des valves tricuspides alors que ce récepteur transmembranaire est impliqué dans l'induction de l'EMT et la répression de gènes spécifiques aux ostéoblastes (Garg, Muth et al. 2005). Enfin, il est apparu que les personnes souffrant du syndrome de Marfan, maladie génétique induite par une mutation autosomique dominante dans le gène codant pour la fibrilline 1, présentent davantage de bicuspidie aortique (Pyeritz 2000).

Pour ce qui est des prédispositions génétiques liées à une modification structurelle et fonctionnelle de la valve aortique impliquant un gène codant pour un élément de l'ECM de la valve aortique, trois maladies génétiques semblent particulièrement concernées par le développement de la Sao :

- le syndrome de Williams induit par une microdélétion hémizygote dans le gène codant pour l'élastine (Hinton, Adelman-Brown et al. 2010),
- l'ostéogénèse imparfaite induite par différentes mutations possibles au sein du gène codant pour la synthèse du procollagène 8 (Wong, Follis et al. 1995),
- le syndrome d'Ehlers-Danlos induite par diverses mutations possibles qui altèrent la synthèse efficace de collagène (Malfait, Symoens et al. 2006).

Enfin, pour ce qui est des anomalies génétiques impliquant une altération du métabolisme du calcium ou des lipides, 2 pathologies génétiques apparaissent comme des facteurs de risque de la Sao :

- la maladie de Paget qui, bien que son origine génétique reste indéterminée, induit une dystrophie osseuse condensante. Elle prédisposerait au développement de la Sao en raison de l'altération du métabolisme calcique systémique qu'elle implique (Dweck, Boon et al. 2012).
- Différents polymorphismes du gène codant pour la synthèse de la lipoprotéine A (LpA) ont été corrélés avec un niveau plasmatique en LpA plus élevé que la moyenne et un risque accru de développement de Sao. En effet, un niveau plasmatique en LpA supérieure 90 mg/dl implique un risque de Sao 3 fois supérieur à la moyenne (Kamstrup, Tybjaerg-Hansen et al. 2014).

### **1.3.3 Facteurs de risque acquis.**

De nombreux facteurs de risque acquis sont communs aux autres pathologies cardiovasculaires et, particulièrement, avec l'athérosclérose. Ainsi, près de 30 à 40 % des patients souffrant de Sao souffrent également d'hypertension artérielle (Pate 2002). Le tabac favorise le développement de la Sao par l'induction de stress oxydatif. Un taux plasmatique élevé en cholestérol, en lipoprotéines, plus particulièrement en LDLs (*Low Density Lipoproteins*), induit l'inflammation valvulaire prédisposant au développement de la Sao. Par conséquent, la survenue d'un diabète ou d'un syndrome métabolique prédispose au développement de Sao. L'urémie, l'ostéoporose, l'insuffisance rénale et un niveau

plasmatique élevé en calcium ou en hormones parathyroïdiennes favorisent les maladies valvulaires (Ginghina, Florian et al. 2009). Enfin, la prise d'un agoniste de la sérotonine dans le cadre d'un traitement contre l'anxiété ou d'un régime est corrélée avec la survenue de Sao, probablement *via* l'activation des VICs (Jian, Xu et al. 2002; Pena-Silva, Miller et al. 2009).

#### **1.4. Symptomatologie et diagnostic.**

Chez certains patients, la Sao ne présente pas de symptômes si ce n'est une intolérance à l'exercice associée à la difficulté du cœur à répondre à l'effort demandé pour une oxygénation optimale et complète de l'organisme. Néanmoins, cette pathologie touchant essentiellement les personnes âgées, il arrive très souvent que ce symptôme soit associé au vieillissement du patient et non à la Sao. Cependant, d'autres symptômes apparaissent fréquemment lors du développement de la Sao. Il s'agit de l'angine de poitrine, de syncopes, de dyspnée et l'arrêt cardiaque car la Sao induit une perturbation majeure de l'approvisionnement des artères coronaires en sang ainsi que l'épaississement de la paroi du ventricule gauche. Dans certains cas, les patients souffrant de Sao présenteront également un syndrome de Willebrand acquis de type 2 caractérisé par un risque de saignement accru (Warkentin, Moore et al. 1992; Stout and Otto 2007).

L'examen physique du patient constitue la première approche diagnostic de Sao avec le développement d'un murmure systolique crescendo-decrescendo dans le second espace intercostal droit. Apparaissant dès l'initiation de la sclérose aortique, il devient de plus en plus fort alors que la Sao devient sévère (Munt, Legget et al. 1999).

L'échocardiographie-Doppler permet de visualiser l'anatomie de la valve aortique, de mesurer la vitesse sanguine et de déterminer l'impact de la Sao sur la paroi du ventricule gauche. L'analyse de l'anatomie de la valve aortique permet ainsi de déterminer, d'une part, la présence ou non de bicuspidie aortique et, d'autre part, de mesurer la surface valvulaire fonctionnelle (non rigidifiée) tout en permettant l'observation, ou non, de calcifications (**Figure 16**). La surface valvulaire fonctionnelle de la valve aortique normale est de 3 à 4 cm<sup>2</sup>. La Société Européenne de Cardiologie a déterminé qu'il y a Sao dès que cette surface est inférieure à 1,5 cm<sup>2</sup> et qu'elle est sévère lorsqu'elle est inférieure à 1 cm<sup>2</sup>. La mesure de la vitesse sanguine au travers de la valve aortique permet, sur base de l'équation de Bernoulli ( $\Delta P=4v^2$ ,  $v$  étant la vitesse des globules rouges), de déterminer la présence et la valeur du

gradient transvalvulaire. Inexistant lorsque la valve aortique est normale, il peut être supérieur à 40 mm Hg en cas de Sao sévère. L'analyse de la paroi du ventricule gauche permet d'établir, s'il y a Sao, la présence d'hypertrophie du ventricule gauche. Bien que secondaire, cette information peut s'avérer cruciale dans le choix d'opérer ou non le patient (Stout and Otto 2007). Dans certains cas, des analyses complémentaires peuvent être effectuées par échocardiographie transoesophagienne, par cathétérisation cardiaque, par angiographie coronarienne et par IRM (Pibarot and Dumesnil 2007; Stout and Otto 2007).

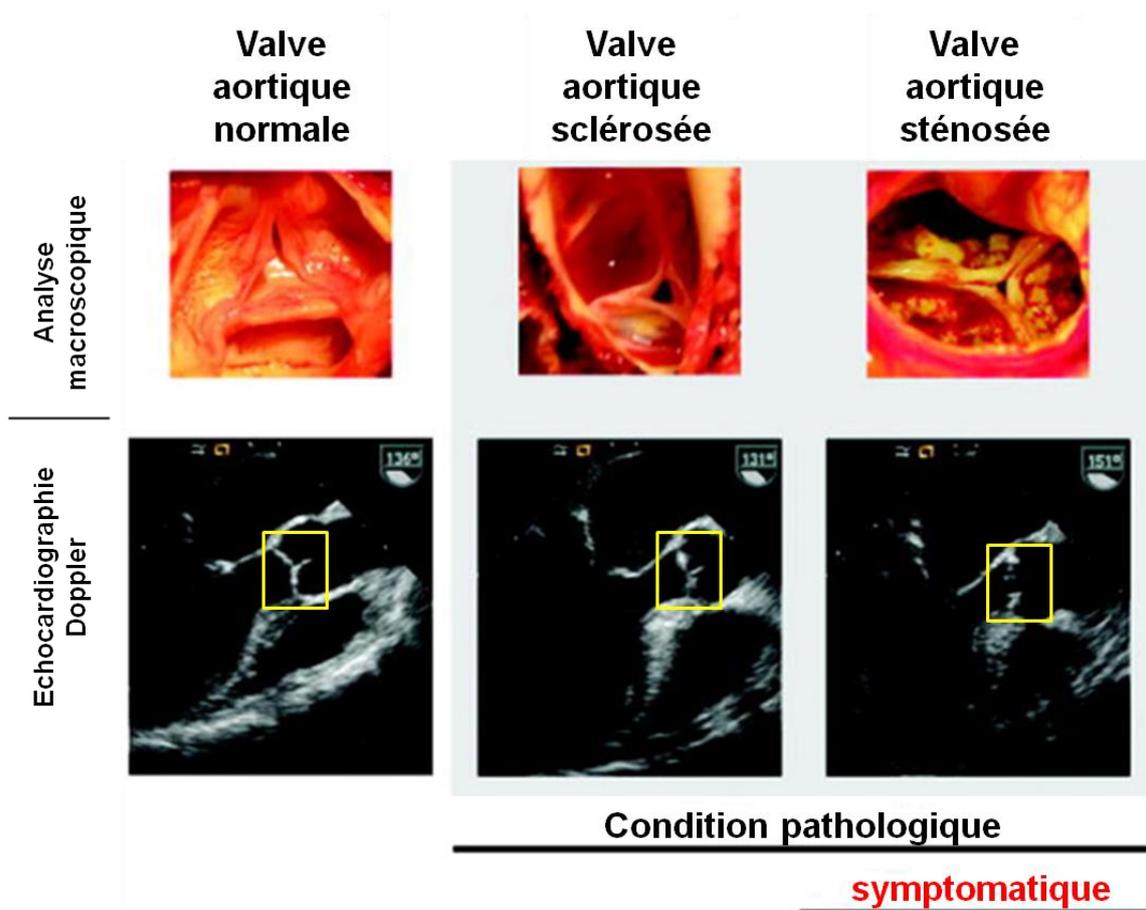


Figure 16 : Analyse macroscopique et en échocardiographie-Doppler de la valve aortique normale, sclérosée et sténosée. D'après Grau, Poggio et al. 2012.

De nombreuses recherches ont été menées afin de trouver un biomarqueur de la Sao. Néanmoins, ceci s'avère extrêmement compliqué. En effet, les patients étant le plus souvent très âgés, ils peuvent, simultanément, présenter plusieurs pathologies pouvant être confondantes. Ainsi, le peptide natriurétique de type B (BNP, *brain natriuretic peptide*) est augmenté chez les patients souffrant de Sao mais il est également un marqueur d'hypertrophie ventriculaire et est fortement influencé par la présence d'une maladie rénale,

d'hypertension pulmonaire et de diabète (Bergler-Klein, Klaar et al. 2004; Weber, Hausen et al. 2006). La protéine C-réactive (CRP, *C-Reactive Protein*) a également été proposée comme biomarqueur de Sao en raison de la forte inflammation du tissu valvulaire. Bien qu'indicatif, il ne peut néanmoins pas être associé exclusivement à la Sao. La fetuine A, protéine matricielle anti-apoptotique, diminue chez les patients atteints de la Sao et semble être un bon biomarqueur (Ix, Chertow et al. 2007). L'ostéoprotégérine, récepteur soluble de RANK-ligand (RANKL, *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) impliqués dans la différenciation ostéoblastique et donc dans la résorption osseuse, est augmentée au sein du tissu valvulaire mais aussi dans le sérum au stade précoce du développement de la Sao. Il semble donc être bon biomarqueur permettant de détecter les patients souffrant de Sao précoce et de prédire le risque de mortalité de patients souffrant de Sao symptomatique (Ueland, Aukrust et al. 2011).

### **1.5. Traitements.**

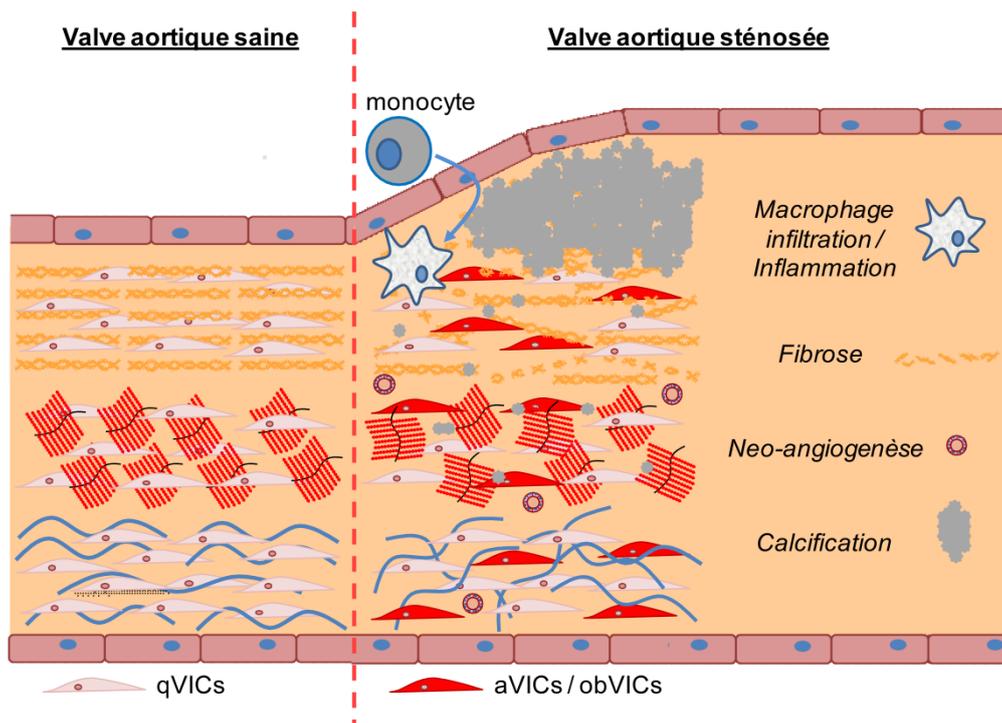
Le remplacement chirurgical de la valve aortique sténosée par une bioprothèse ou une valve mécanique est actuellement le traitement de référence de la Sao. Sans chirurgie, le taux de mortalité à un an d'un patient souffrant de Sao sévère est d'un peu moins de 50 %. Cependant, un certain nombre de patients à haut risque en raison de leurs âges, de leurs antécédents cardiaques ou de leurs comorbidités (pathologie respiratoire, antécédents neurologiques, altérations des fonctions cognitives, etc) ne peuvent pas être opérés (Thaden, Nkomo et al. 2014). Afin d'éviter le risque de la chirurgie cardiaque chez ces patients, une nouvelle technique de remplacement valvulaire a été mise au point : le TAVI (*Transcatheter aortic valve implantation*) qui consiste à remplacer la valve aortique par voie percutanée. Employé en cas de morbidité importante, l'étude la plus récente a démontré que le TAVI réduit significativement le taux de mortalité, toutes causes confondues par rapport au remplacement valvulaire chirurgical classique (14,2 % contre 19,1 %, réciproquement) (Adams, Popma et al. 2014). A ce jour, il n'existe aucun traitement pharmacologique pour traiter ou prévenir la Sao. Néanmoins, les recherches dans ce domaine sont nombreuses (Stout and Otto 2007).

Suite aux nombreux points communs entre la physiopathologie de la Sao et de l'athérosclérose, il a été suggéré que les traitements utilisés dans la prévention et le traitement de l'athérosclérose pourraient être également efficaces pour la prévention de la Sao ou pour limiter son évolution. Ainsi, dans le cadre de l'athérosclérose, les statines

agissent en inhibant l'HMG-Coa reductase (hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase), enzyme impliquée dans le métabolisme du cholestérol. Dans le cadre de la Sao, des études rétrospectives ont montré qu'un traitement par statine chez des patients porteurs d'une Sao légère à modérée permettaient de ralentir le développement de la Sao (Novaro, Tiong et al. 2001; Rajamannan and Otto 2004; Moura, Ramos et al. 2007). Néanmoins, les études prospectives (SALTIRE, SEAS et ASTRONOMER) ont montré qu'un traitement par statine n'avait pas d'effet bénéfique sur la Sao (Cowell, Newby et al. 2005; Chan, Teo et al. 2010; Holme, Boman et al. 2010). Toutefois, ces études ont été réalisées sur des populations avec une Sao modérée à sévère, sous-estimant possiblement la capacité du traitement à limiter l'évolution de cette pathologie (Parisi, Leosco et al. 2015). Enfin le resvératrol apparaît depuis peu comme un candidat thérapeutique sérieux puisqu'il régule négativement la voie de signalisation NFκB impliquée dans le processus inflammatoire et anti-oxydant (Ignatowicz and Baer-Dubowska 2001; Ren, Wang et al. 2013).

## **2. Physiopathologie.**

Selon la définition de l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'athérosclérose est "une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre, consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, le tout s'accompagnant de modifications de la média". Or, la pathologie valvulaire aortique est initiée par l'accumulation interne de lipides ayant pour conséquence une réaction inflammatoire locale. Cette inflammation induit alors, dans un premier temps, la fibrose du tissu valvulaire (sclérose) et, dans un second temps, sa calcification (sténose). Le tissu valvulaire aortique s'épaississant progressivement, les cellules qui étaient initialement fournies passivement en nutriments et en oxygène en raison de la faible épaisseur de la valve se retrouvent en souffrance et initient alors la néo-angiogenèse. Inflammation, fibrose, calcification et néoangiogenèse caractérisent donc la physiopathologie de la Sao qui est ainsi décrite comme « *atherosclerosis-like* » (**Figure 17**) (Butcher, Mahler et al. 2011).



**Figure 17 : Représentation schématique de la physiopathologie de la sténose aortique.**

Décrite comme une pathologie « atherosclerosis-like », la physiopathologie de la sténose aortique implique 4 processus également présents dans la physiopathologie de l'athérosclérose : l'inflammation, la fibrose, la néo-angiogenèse et la formation de calcification.

### **2.1. Mécanismes physiopathologiques.**

Il est important de rappeler que les premiers mécanismes impliqués dans cette pathologie sont initialement induit dans le cadre d'une réparation tissulaire contrôlée. En effet, la valve aortique et, plus précisément, son endothélium peut être endommagées par les nombreuses forces hémodynamiques qu'elle subit. L'inflammation consécutive a alors pour but la réparation du tissu lésé, essentiellement, par l'activation de qVICs. Lorsque cette réparation tissulaire est achevée, l'inflammation est alors résorbée et les aVICs éliminées par apoptose. La perte de contrôle de ces mécanismes a pour conséquence le développement de la sclérose puis de la sténose aortique (Helske, Kupari et al. 2007). La diminution progressive de la surface valvulaire fonctionnelle induit des perturbations hémodynamiques de plus en plus fortes qui contribuent à l'amplification du stress appliqué sur la valve. Celle-ci est de moins en moins capable de répondre efficacement à ce stress, d'où l'amplification de l'inflammation, de la fibrose, de la néo-angiogenèse et la formation de calcifications. De plus, dans le cadre de la Sao sévère, les lésions répétées de l'endothélium constituent un milieu pro-agrégant. Il n'est donc pas rare d'observer la présence d'un thrombus au sein de la valve (Stein, Sabbah et al. 1977). Cependant, la Sao est une pathologie lente puisque son évolution

annuelle correspond à une régression de la surface valvulaire fonctionnelle de 0,1 cm<sup>2</sup> (Otto, Burwash et al. 1997).

### 2.1.1 Inflammation.

À l'exception de quelques mastocytes inactifs, la valve aortique normale est dépourvue de cellules inflammatoires (Otto, Kuusisto et al. 1994). Chronologiquement, l'inflammation est le premier mécanisme physiopathologique subit par la valve.

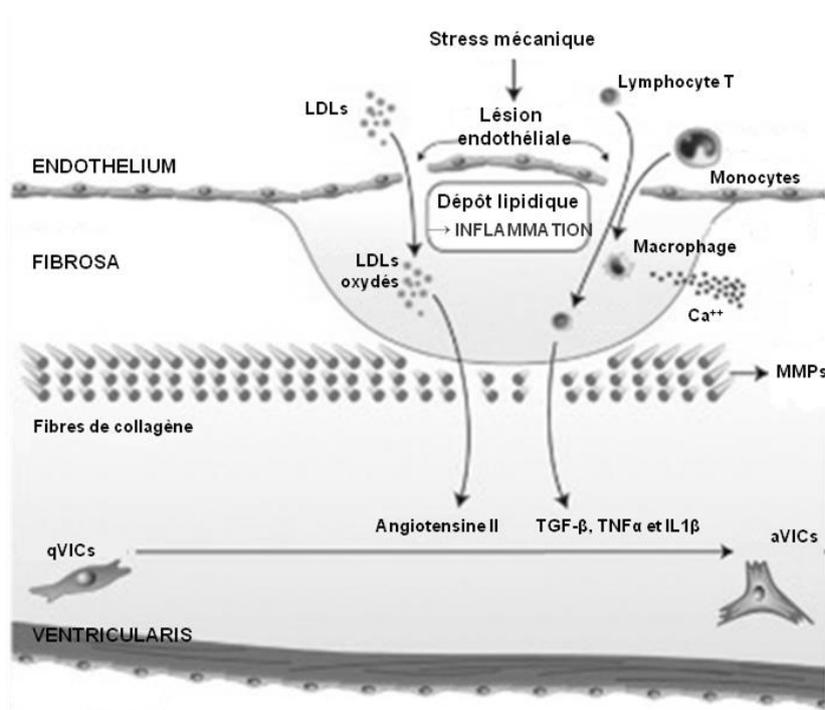
Ainsi, la lésion de l'endothélium provoquée par les forces hémodynamiques crée une brèche permettant l'intrusion intravalvulaire de cholestérol et de lipoprotéines tels que les LDLs qui constituent alors un foyer de dépôts lipidiques intra et extracellulaire (**Figure 18**) (Chan 2003). L'agression de la barrière endothéliale et la présence de ces dépôts lipidiques activent les cellules endothéliales qui expriment et mobilisent un grand nombre de récepteurs inflammatoires tels que l'E-sélectine (*endothelial selectin*) et VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*) (Ghaisas, Foley et al. 2000). La présence de ces récepteurs permettent le recrutement important au sein du tissu valvulaire de cellules inflammatoires telles que les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T et les mastocytes dans lequel elles induisent une forte réaction inflammatoire (Otto, Kuusisto et al. 1994). Les macrophages recrutés induisent l'oxydation des LDLs, puissants inducteurs de l'expression du TNF $\alpha$ , et produisent de nombreux médiateurs proinflammatoires tels que le TGF- $\beta$  et le TNF $\alpha$  qu'ils libèrent lors de leurs morts cellulaires (**Figure 18**) (Mahler and Butcher 2011).

Les mastocytes, activés par les cytokines pro-inflammatoires, renforcent encore la réaction inflammatoire par l'activation du système rénine-angiotensine. En effet, ces cellules inflammatoires sécrètent l'*Angiotensin-Converting Enzyme* (ACE) qui active l'angiotensine II (ANGII) exprimée par les cellules endothéliales. Sa liaison au récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT1) des macrophages induit l'accumulation de cholestérol au sein des macrophages et l'initiation du stress oxydatif. De plus, les mastocytes activés libèrent de l'histamine, de l'héparine et des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  (**Figure 16**) (Kaden, Dempfle et al. 2003; Helske, Lindstedt et al. 2004).

L'inhibition d'enzymes aux propriétés antioxydantes telles que la superoxyde dismutase et la catalase et la perte de l'équilibre redox de l'état cellulaire induite par la perturbation de la balance thioredoxine (Trx) et de son inhibiteur, TXNIP (*thioredoxin-interacting protein*)

amplifie le stress oxydatif valvulaire et l'inflammation par la production facilitée d'IL1 $\beta$  (Helske, Laine et al. 2007; Liesmaa, Leskinen et al. 2009).

Les cellules endothéliales acquièrent un phénotype pro-oxydant en plus de leur phénotype pro-inflammatoire par l'expression de NADPH et de ROS (*Reactive Oxygen Species*). La présence de ce stress oxydatif a pour conséquence l'inhibition de l'expression d'eNOS et donc une réduction du NO, vasodilatateur puissant aux propriétés athéro-protectrices. Cette réduction de NO peut expliquer pourquoi les aVICs appliquent plus de tension sur les éléments de l'ECM puisque cette molécule assure la relaxation des VICs au sein de la valve normale (El-Hamamsy, Balachandran et al. 2009). La contraction des VICs est aussi induite par la présence de l'ANGII (**Figure 16**).

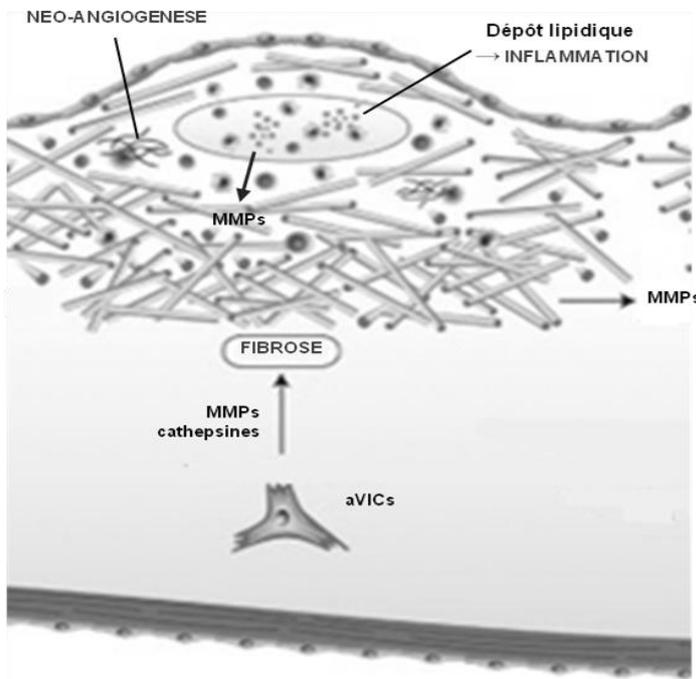


**Figure 18 : Représentation schématique des principaux mécanismes de l'inflammation.** Légende : aVICs : VICs activées, LDLs : lipoprotéines, MMPs : métalloprotéinases matricielles et qVICs : VICs quiescentes. D'après Dweck, Boon et coll. 2012.

### 2.1.2 Fibrose et remaniement de l'ECM.

Initié par la réaction inflammatoire, le remaniement de l'ECM est assuré par les aVICs. En effet, les cytokines inflammatoires produites induisent l'activation des VICs qui, d'une part, renforcent l'inflammation du tissu valvulaire et, d'autre part, assurent la réparation tissulaire (O'Brien, Shavelle et al. 2002; Helske, Lindstedt et al. 2004). En effet, l'IL1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  induit le basculement du phénotype qVICs en aVICs *via* la phosphorylation de Smad 2/3 (**Figure 19**). Les aVICs secrètent ainsi massivement le FGF-2, les différents éléments de l'ECM et reconstruisent l'architecture tissulaire de la valve grâce aux protéases

qu'elles synthétisent : MMP-1, -2, -3, -9 et -12 ainsi que les cathepsines S, K et V, enzymes également produites par les lymphocytes T et les macrophages (**Figure 19**) (Edep, Shirani et al. 2000; Satta, Oiva et al. 2003; Fondard, Detaint et al. 2005; Han and Gotlieb 2012).



**Figure 19 : Représentation schématique des principaux mécanismes de la fibrosa.**

Légende : aVICs : VICs activées et MMPs : métalloprotéinases matricielles. D'après Dweck, Boon et coll. 2012.

De plus, au sein de la valve normale, le système rénine-angiotensine, système profibrotique, est physiologiquement équilibré par le système kinine-kallikréine, système antifibrotique. Cependant, la présence accrue de l'ACE entraîne la dégradation de la bradykinine, médiateur principal du système kinine-kallikréine. Il y a ainsi renforcement du déséquilibre entre ces 2 systèmes en faveur du système rénine-angiotensine et donc de la fibrose tissulaire (Helske, Lindstedt et al. 2004; Helske, Laine et al. 2007).

De plus, les MMPs sont sécrétées au sein de l'ECM sous forme zymogène, inactive, les pro-MMPs. Celles-ci seront activées par la plasmine, élément-clé de la fibrinolyse, elle-même activée par l'activateur du plasminogène (t-PA, *tissue Plasminogen Activator*) et l'urokinase (u-PA, *urokinase-type Plasminogen Activator*) ; tous trois présent au sein de la valve aortique sténosée (Lijnen 2001; Kochtebane, Choqueux et al. 2010).

La fibrose du tissu valvulaire apparaît lorsque la balance synthèse/dégradation est déséquilibrée en faveur d'un excès de synthèse d'ECM (Kochtebane, Choqueux et al. 2012). La fibrose du tissu valvulaire peut, à son tour, amplifier la réaction inflammatoire *via* la production plus abondante de biglycan, protéoglycane de la spongiosa. Par sa capacité à

s'associer aux LDLs, il favorise leur rétention au sein du tissu valvulaire et donc, l'inflammation (Mathieu and Boulanger 2014).

Si le processus de fibrose permet de compenser la dégradation de l'ECM associée au collagène, la dégradation des fibres élastiques constituées d'élastine n'est pas compensée puisque la production de ces fibres s'arrête à la puberté. Par conséquent, la ventricularis est alors constituée de fibres élastiques fragmentées et désorganisées (Hinton, Lincoln et al. 2006). La fibrose du tissu valvulaire et la dégradation des fibres élastiques contribuent à la rigidification de la valve aortique.

### 2.1.3 Néo-angiogenèse.

L'inflammation du tissu valvulaire et la néo-angiogenèse sont étroitement liées puisque les VICs activées et certaines cellules inflammatoires expriment davantage de facteurs pro-angiogéniques et inhibent l'expression de facteurs anti-angiogéniques. Le VEGF et ses récepteurs 1 et 2, Tie 2 et la périostine, facteurs pro-angiogéniques sont ainsi surexprimés (Soini, Salo et al. 2003; Hakuno, Kimura et al. 2010) contrairement à la chondromoduline-1, à l'endostatine et à SPARC, facteurs anti-angiogéniques, qui sont inhibées (Chalajour, Treede et al. 2004; Charest, Pepin et al. 2006; Yoshioka, Yuasa et al. 2006). Par la présence de FGF-2, la fibrose et le remodelage tissulaire induisent aussi la néo-angiogenèse *via* la voie de signalisation TGF $\beta$ /Smad (**Figure 19**) (Conery, Cao et al. 2004; Taylor and Wrana 2008).

Les conséquences de la vascularisation du tissu valvulaire sont (1) l'amplification de la réaction inflammatoire par l'infiltration de nouvelles cellules inflammatoires comme le démontre la corrélation positive entre la présence de lymphocyte T et les néo-vaisseaux sanguins (Mazzone, Epistolato et al. 2004) et (2) l'hémorragie intravalvulaire présente chez 78 % des patients atteints de Sao sévère (Akahori, Tsujino et al. 2011).

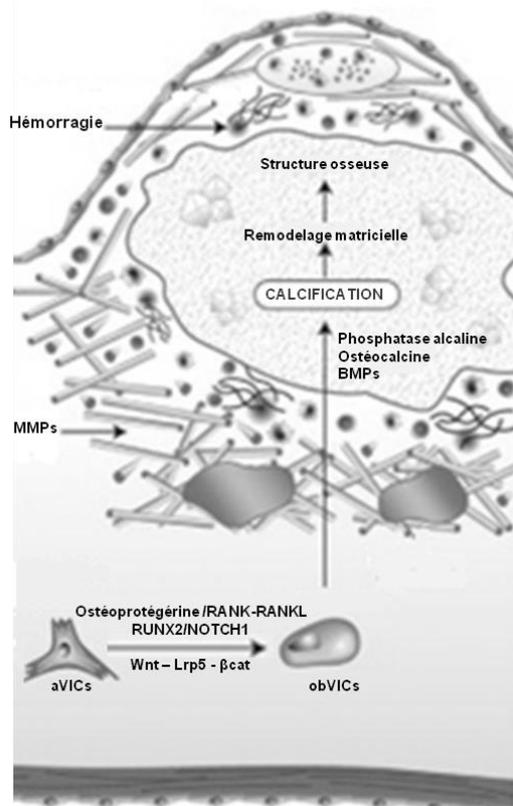
### 2.1.4 Calcifications

Les calcifications présentes au sein de la valve aortique sténosée sont constituées de calciums et d'hydroxyapatite formant une structure similaire à de l'os (Higgins, Marvel et al. 2005). Les mécanismes précis impliqués dans la calcification sont néanmoins sujet à controverse. En effet, 2 hypothèses distinctes pourraient expliquer leur formation : d'une part, il y a la théorie de la calcification dystrophique et, d'autre part, la théorie de la différenciation ostéogénique/de l'ossification (Butcher, Mahler et al. 2011).

Le principe de la calcification dystrophique s'appuie sur le fait que les calcifications valvulaires présentent un nombre non négligeable de cellules apoptotiques et/ou nécrotiques qui contribueraient à la formation de calcifications par la libération d'une grande quantité de calcium lors de leur apoptose/nécrose (Yip, Chen et al. 2009). Cette apoptose peut être induite soit par le TGF- $\beta$ 1 secrétée par les cellules inflammatoires, soit par la présence de plasmine puisque la protéolyse des interactions entre les cellules et l'ECM constitue un mécanisme d'induction de l'apoptose par perte d'adhérence cellulaire (Proudfoot, Skepper et al. 2000; Jian, Narula et al. 2003; Kochtebane, Choqueux et al. 2010). Il a été montré par coloration immunohistochimique et *oil Red O* que les nodules de calcification étaient colocalisés avec les zones de dépôts lipidiques (LDLs oxydées) et des cellules inflammatoires telles que les lymphocytes T (Olsson, Thyberg et al. 1999). La calcification du tissu valvulaire serait donc consécutive à la présence de lipides et de la réaction inflammatoire (Mohler, Chawla et al. 1999). En effet, il a été montré que la phospholipase A2 associée aux lipoprotéines (Lp-PLA2, *lipoprotein-associated phospholipase A2*) est surexprimée au sein de la valve sténosée. Cette enzyme convertit alors les LDLs oxydées en lysophosphatidylcholine (LPC), puissant promoteur de la minéralisation au travers de la voie de l'adénosine monophosphate cyclique/protéine kinase A (AMPC/PKA) (Mahmut, Boulanger et al. 2014). Il a été aussi montré par colorations immunohistochimiques et stimulation cellulaire *in vitro* que la ténascine-C, glycoprotéine matricielle impliquée dans la formation osseuse et cartilagineuse, est présente en même proportion que la MMP-2 au sein de la valve aortique sténosée et qu'elle est capable d'induire l'expression de cette métalloprotéinase en culture. Induite par les nombreuses cytokines inflammatoires présentes, elle serait donc impliquée dans le processus de calcification dystrophique car, outre le fait qu'elle stimule la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire, elle est également responsable de l'apoptose cellulaire (Jian, Jones et al. 2001; Satta, Melkko et al. 2002).

Le principe de la différenciation ostéogénique décrit comme un processus actif de calcification s'appuie sur la présence d'obVICs exprimant fortement divers facteurs pro-ostéogéniques comme l'ostéonectine, l'ostéocalcine, le facteur de transcription RUNX2 ainsi que la phosphatase alcaline et la sialoprotéine alors qu'elles réduisent l'expression de facteurs anti-ostéogéniques tels que l'ostéopontine et l'ostéoprotégérine au sein de la valve sténosée (**Figure 18**) (Mohler, Chawla et al. 1999; Garg, Muth et al. 2005; Osman, Yacoub

et al. 2006; Bostrom, Rajamannan et al. 2011). Il a été démontré que, au sein de valves sténosées, l'augmentation significative de l'expression de RANKL est concomitante à la diminution significative de cellules positive à l'ostéoprotégérine (Kaden, Bickelhaupt et al. 2004). De plus, RANKL induit la différenciation ostéoblastique *via* la voie de signalisation médiée par l'ostéoprotégérine/RANK-RANKL (Kaden, Bickelhaupt et al. 2004). La présence d'obVICs est issue de la différenciation cellulaire d'aVICs initiée par la réaction inflammatoire. En effet, les cytokines inflammatoires présentes induisent l'augmentation de l'expression de BMP-2 et -4 par les cellules endothéliales activées. Au niveau des aVICs, ces BMPs initie les voies de signalisation cellulaires RUNX2/NOTCH1 et Wnt - Lrp5 -  $\beta$ cat qui induisent la différenciation ostéoblastique (**Figure 20**) (Rajamannan, Subramaniam et al. 2005; Caira, Stock et al. 2006). Cette voie RUNX2/NOTCH1 est renforcée par l'expression réduite du microARN-30b, microARN impliqué dans l'inhibition de l'expression de RUNX2 (Zhang, Liu et al. 2014). De plus, l'expression de la protéine matricielle Gla (MGP, *matrix Gla-protein*) est inhibée au sein des valves sténosées en raison de son potentiel anti-calcifiant. En effet, en condition physiologique, elle inhibe la différenciation ostéoblastique des VICs par liaison et inhibition des BMPs (Schurgers, Cranenburg et al. 2008). La fetuine A, protéine anti-calcifiante appartenant à la famille des inhibiteurs des cystéines protéases, est inhibée au sein des valves sténosées (Binkert, Demetriou et al. 1999). Enfin, il a été montré par immunohistochimie que les HDLs (*high density lipoproteins*) étaient colocalisés avec les calcifications présentes au sein de valves sténosées. L'infiltration de ces lipoprotéines au sein de la valve induirait la différenciation ostéoblastique puisque les apolipoprotéines A portées à la surface des HDLs contribuent à la formation de protéines amyloïdes capable de promouvoir la différenciation ostéoblastique des aVICs (Audet, Cote et al. 2012).



**Figure 20 : Représentation schématique des principaux mécanismes de la calcification induite par différenciation ostéogénique.**

Légende : aVICs : VICs activées, BMPs : *bone morphogenetic proteins*, MMPs : métalloprotéinases matricielles et obVICs : VICs ostéoblastiques.

D'après Dweck, Boon et coll. 2012.

Néanmoins, il apparaît de plus en plus que ces 2 hypothèses sont non-exclusives et qu'elles seraient toutes 2 complémentaires. En effet, il a été montré que la pyrophosphatase ectonucleotide/phosphodiesterase 1 (ENPP1, *ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1*) est surexprimée au sein de la valve sténosée suite à l'augmentation des stress mécaniques intravalvulaires (Cote, El Hussein et al. 2012). Par dégradation de l'ATP produit par les VICs, l'ENPP1 induit la minéralisation de la valve car le pyrophosphate (PPi) produit est dégradé en phosphate inorganique par les obVICs. En effet, en présence du calcium libéré par les cellules apoptotiques, ce phosphate inorganique forme un précipité solide (Mathieu 2012). De plus, alors que l'ATP inhibe l'apoptose par sa fixation au récepteur P2Y2, sa dégradation par l'ENPP1 amplifie la minéralisation de la valve (Cote, El Hussein et al. 2012). Enfin, il a été montré que le TGF-β1, en plus de sa capacité à initier la formation de calcifications dystrophiques par induction de l'apoptose, induit l'expression de l'OB-CDH par les aVICs *via* la voie de signalisation Erk1/2. Or la surexpression de cette cadhérine correspond à une des étapes-clés de la différenciation ostéoblastique *via* l'activation de la voie Wnt (Hutcheson, Chen et al. 2013). Ainsi, l'ossification active de la valve aortique promeut sa minéralisation passive et réciproquement.

La présence de calcifications épaissit et rigidifie considérablement la valve (Helske, Kupari et al. 2007; Mathieu and Boulanger 2014). Ce processus induit en retour la néo-angiogenèse du tissu valvulaire puisque l'ostéonectine sécrétée par les obVICs est capable de dégrader les MMPs en peptides pro-angiogéniques (Mathieu and Boulanger 2014).

### **III. Le facteur tissulaire (FT).**

#### **1. Physiologie du FT.**

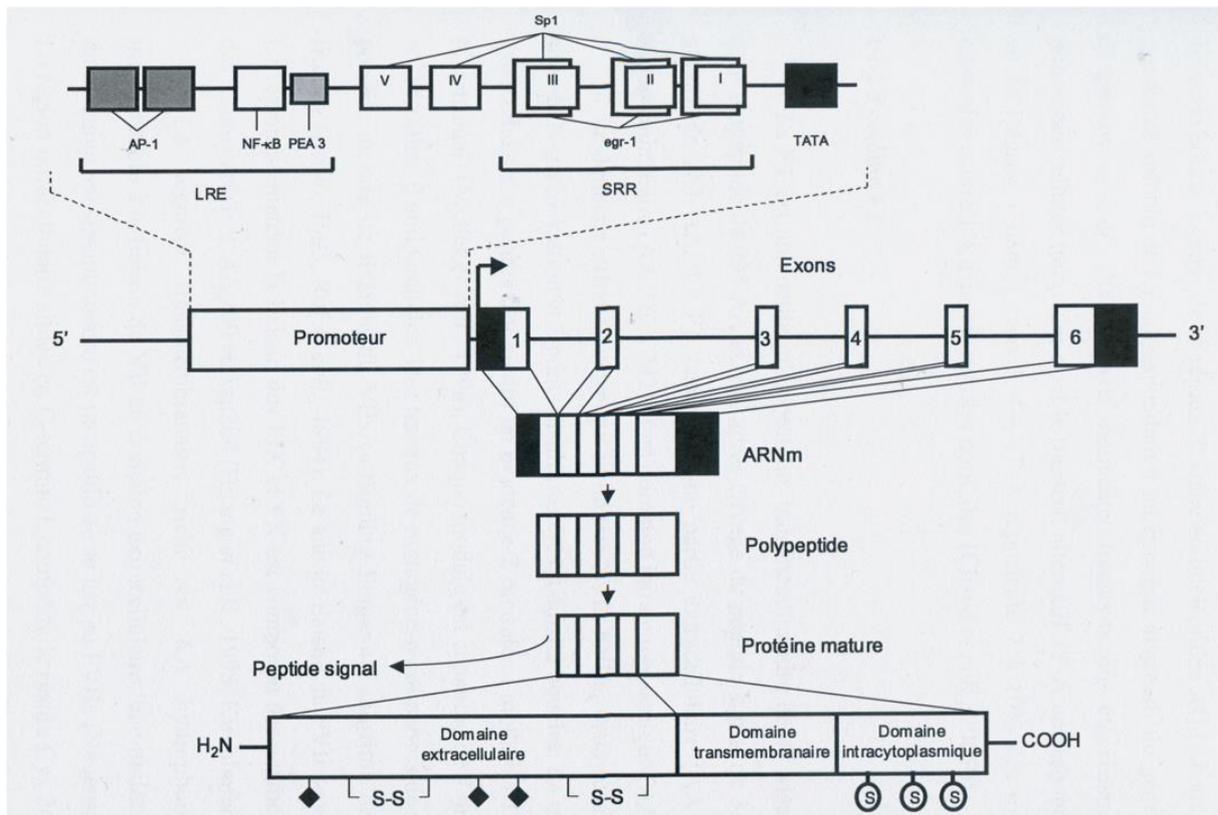
##### **1.1. Généralités.**

Egalement appelé « thromboplastine » ou en encore « facteur III », le facteur tissulaire (FT) est une protéine-clé de la coagulation sanguine puisqu'il en est le principal initiateur. Par sa structure, il appartient à la sous-classe II de la superfamille des récepteurs aux cytokines. Classé sous la dénomination CD142 (pour cluster de différenciation 142) parmi les antigènes leucocytaires, le FT est une glycoprotéine transmembranaire capable d'initier la cascade de coagulation en tant que récepteur de haute affinité du facteur VII (FVII), du facteur VII activé (FVIIa) permettant l'activation des facteurs IX et X (McVey 1994). Le FT est impliqué dans les processus d'inflammation, d'angiogenèse, de dissémination métastatique et de migration cellulaire *via* l'activation du récepteur PAR (*Protease Activated Receptor*) par le complexe FT-FVIIa. Il joue un rôle crucial dans différentes pathologies telles que le sepsis, le cancer et l'athérosclérose.

##### **1.2. Gène du FT.**

Situé en position 1p21-22 du chromosome 1, le gène du FT est constitué de 12,4 kb comprenant 6 exons et 5 introns. L'expression du gène du FT, dont la partie codante est de 885 pb, est régulée par un promoteur situé en 5', en amont de la partie codante. Ce promoteur est constitué d'une séquence TATA $_{box}$ , une séquence enhancer proximale : SRR (*Serum Response Region*) et une séquence LRE (*Lipopolysaccharide Response Element*). La région SRR est responsable de l'expression constitutive du FT par de nombreuses lignées cellulaires grâce à ses interactions avec les facteurs de transcription de la famille Sp-1 (*Stimulating protein-1*) (Cui, Parry et al. 1996). De plus, *via* la présence de 3 sites de fixation de facteurs de transcription de type EGR-1 (*Early Growth Region-1*), cette séquence SRR peut également induire l'expression du FT en réponse à des stimuli inflammatoires tels

que le LPS (LipoPolySaccharide) et le stress oxydatif (Houston, Dickson et al. 1999; Guha, O'Connell et al. 2001). Situé entre -227 et -172 pb, la séquence LRE est constituée de 2 sites AP-1 (*Activator Protein-1*) et d'un site NFκB (*Nuclear Factor Kappa B*) qui chevauche une région NFAT (*Nuclear Factor of Activated T Cells*) (Mackman 1997; Armesilla, Lorenzo et al. 1999). La régulation de l'expression inductible du FT après stimulation à l'IL1β, au TNFα et au LPS est effectuée par la séquence LRE (**Figure 21**) (Mackman, Brand et al. 1991; Oeth, Parry et al. 1997).



**Figure 21 : Structure du gène FT.**

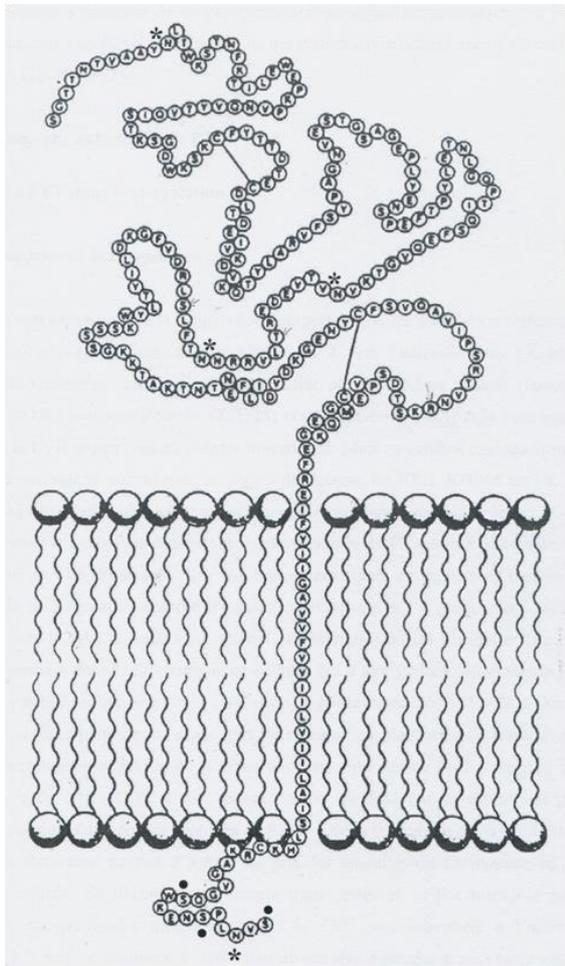
Constituée de la séquence TATAbox, la région promotrice contient également le LPS *Responsive Element* (LRE) et le *Serum growth factor Responsive region* (SRR) qui régulent l'expression constitutive et inductible du FT. Les rectangles noirs des exons 1 et 6 du gène indiquent que ces parties ne sont traduites. Plus précisément, l'exon 1 code pour le site d'initiation de la transcription et le peptide signal, les exons 2 à 5 codent pour le domaine extracellulaire et l'exon 6 code pour les domaines transmembranaire et intracytoplasmique.

Légende : losange noir : site de N-glycosylation, S-S : pont disulfure et (S) : sérine phosphorylable. D'après Eilertsen, K. E. and B. Osterud, 2004.

### 1.3. Protéine du FT.

Synthétisé sous forme d'un propeptide de 295 acides aminés (AA), le FT est une glycoprotéine transmembranaire de 47 kDa. Elle devient une protéine mature de 263 AA après le clivage d'un peptide signal de 32 AA. Le FT possède une partie extracellulaire

correspondant aux AA 1 à 219, un domaine transmembranaire de l'AA 220 à 242 et un domaine intra-cytoplasmique de l'AA 243 à 263 (**Figure 22**) (Morrissey, Fakhrai et al. 1987; Spicer, Horton et al. 1987).



**Figure 22 : Structure du facteur tissulaire humain dans sa conformation fonctionnelle.**

Le FT est une glycoprotéine transmembranaire de 263 AA qui, par conséquent, comporte un domaine extracellulaire, transmembranaire et intracytoplasmique.

Légende : \* : site de N-glycosylation et • : site de phosphorylation.

D'après O'Brien, 1989.

### 1.3.1 Le domaine extracellulaire.

L'analyse par cristallographie de ce domaine a permis d'identifier sa composition (Harlos, Martin et al. 1994; Muller, Ultsch et al. 1996). Ainsi, le domaine extracellulaire est composé de 2 sous-domaines : N-terminal et C-terminal qui sont reliés l'un à l'autre par un pont polypeptidique entre la Pro102 et l'Asp107. Chacun de ses sous-domaines est constitué de 7 brins  $\beta$  répartis eux-mêmes en 2 feuillets  $\beta$  antiparallèles.

La présence de 3 sites de N-glycosylation (Asn11, Asn124 et Asn137) (Paborsky, Fendly et al. 1990; Boys, Miller et al. 1993), induit des modifications post-traductionnelles du FT afin d'éviter sa dégradation protéolytique et accroître son activité pro-coagulante (Paborsky, Fendly et al. 1990; Krudysz-Amblo, Jennings et al. 2010). Le domaine extracellulaire est

également composé de 2 ponts disulfures : en N-terminal entre la Cys49 et la Cys57 et en C-terminal entre la Cys186 et la Cys 209. Alors que le premier pont disulfure est un pont de structure, le second est un pont fonctionnel de type allostérique (Hogg 2009). Il a été montré par mutagenèse dirigée que ce pont disulfure joue un rôle dans l'affinité du FT pour son ligand, le FVIIa. La suppression de ce pont disulfure a pour double conséquence la perte de l'activité pro-coagulante du FT, d'une part, et, d'autre part, un « switch » de l'activité du FT vers une fonction de signalisation (Rehemtulla, Ruf et al. 1991; Ahamed, Versteeg et al. 2006; Kothari, Nayak et al. 2010).

Le sous-domaine C-terminal contient le site de fixation du FVIIa constitué des AA inclus entre la Thr132 et la Ser142 alors que le site de liaison du FVII est situé entre les 2 sous-domaines (Ruf, Schullek et al. 1994; Kelley, Costas et al. 1995). Les sites de liaison pour les FIX et FX sont constitués des segments Tyr157 – Tyr185 et des résidus Asn 199, Arg200 et Asp204 (Huang, Syed et al. 1998; Kirchhofer, Lipari et al. 2000).

### **1.3.2 Le domaine transmembranaire.**

Riche en acides aminés hydrophobes, le domaine transmembranaire est essentiel à la formation du complexe FT/FVIIa et donc à l'induction de l'activité pro-coagulante du FT. En effet, le FT soluble, dépourvu de ce domaine, est incapable de fixer et d'activer le FVII (Ruf, Rehemtulla et al. 1991; Morrissey, Neuenschwander et al. 1997). Ce domaine est nécessaire pour l'auto-activation du FVII (Fiore, Neuenschwander et al. 1994).

### **1.3.3 Le domaine intracytoplasmique.**

Très court (21 AA), le domaine intracytoplasmique contient néanmoins 2 sites de phosphorylation : Ser253 et Ser258. Le site de phosphorylation en Ser253 est un site consensus impliquant la protéine kinase C (PKC) alors que le site en Ser258 est indépendant de la PKC. La Ser258 est impliquée dans la signalisation induite par le complexe FT/FVIIa (Sen, Herzik et al. 2009). La régulation de la phosphorylation de cette sérine est complexe puisqu'elle implique une régulation positive dépendante de la phosphorylation de la Ser253 et une régulation négative dépendante de la palmitoylation de la Cys245.

#### **1.4. Expression du FT.**

Le FT est fortement présent au sein des organes richement vascularisés comme les poumons, le placenta, le cerveau et les capsules du foie, de la rate et des reins où il est exprimé constitutivement. *A contrario*, le FT est très peu présent au sein des articulations et des muscles squelettiques (Drake, Morrissey et al. 1989). Le FT aurait donc pour fonction de protéger les organes très vascularisés d'une éventuelle brèche vasculaire. Au niveau des vaisseaux sanguins, le FT est essentiellement retrouvé au sein de l'adventice des artères saines. Indétectable au niveau de l'endothélium, il est présent dans la média qu'en très faible quantité (Wilcox, Smith et al. 1989; Weiss, Hoffmann et al. 1994). Non exprimé par les lignées érythroblastique et mégacaryocytaire car en contact avec les différents facteurs de la coagulation plasmatique, certaines cellules sanguines expriment le FT comme une sous-population de lymphocytes B, les polynucléaires neutrophiles et les monocytes, ces dernières étant la principale source de FT dans le sang (Giesen, Rauch et al. 1999; Imamura, Kaneda et al. 2002; Mechiche, Cornillet-Lefebvre et al. 2005). Les plaquettes exprimeraient quant à elles de très faibles quantités de FT au niveau de leur membrane, qu'elles soient activées ou non (Siddiqui, Desai et al. 2002; Camera, Frigerio et al. 2003).

Pour ce qui est des autres types cellulaires, le FT est très peu exprimé par les cellules musculaires lisses (CMLs) alors que son expression est constitutive dans les fibroblastes, les cardiomyocytes, les adipocytes, les hépatocytes, les cellules épithéliales cutanée et pulmonaire, les cellules stromales de l'endomètre, les cellules glomérulaires et les cellules de Schwann (Daubie, Pochet et al. 2007).

#### **1.5. Régulation de l'expression du FT.**

##### **1.5.1 Régulation positive.**

En dehors des organes fortement vascularisés et en condition physiologique, le FT est peu exprimé par les cellules au repos. Au sein des monocytes, l'expression du FT est induite par de nombreux agents de la réaction inflammatoire : les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 $\alpha$  et  $\beta$ , le TNF $\alpha$ , l'IL8 et l'IL6, les fragments activés du complément et les complexes immuns (Osterud, Olsen et al. 1984; Carlsen, Flatmark et al. 1988; Conkling, Greenberg et al. 1988; Herbert, Savi et al. 1992; Osnes, Foss et al. 1996; Neumann, Ott et al. 1997). La synthèse du FT par les monocytes peut être également induit par de nombreux métabolites lipidiques comme les LDLs, les VLDLs (*Very Low Density Lipoproteins*) et le cholestérol

libre ou estérifié (Lesnik, Rouis et al. 1992). De plus, au sein du tissu pulmonaire, les cellules mononucléées peuvent produire du FT en cas d'acidose ou d'hypoxie (Lawson, Yan et al. 1997). Néanmoins, l'endotoxine bactérienne LPS reste l'inducteur direct le plus puissant de l'activité FT (Oeth, Parry et al. 1997).

En condition physiologique, l'endothélium n'exprime pas de FT mais, *in vitro*, cette expression peut être induite par le LPS, le TNF $\alpha$ , l'IL1 $\beta$ , la CRP, et les histamines (Cirillo, Golino et al. 2005; Eto, Kouroedov et al. 2005; Puhmann, Weinreich et al. 2005; Steffel, Akhmedov et al. 2005; Wu and Aird 2005). Au niveau de la plaque d'athérosclérose, il a été montré que les cellules endothéliales, préalablement stimulées par du LPS, pourraient accroître l'expression du FT suite à une exposition à de l'hémoglobine libre ou encore, à de la fibrine (Roth 1994; Contrino, Goralnick et al. 1997). De plus, il a été montré sur des modèles de culture *in vitro* de monocytes et de cellules endothéliales que le FXa et la thrombine (FIIa), acteurs de la coagulation, régulent positivement l'expression du FT par ces cellules (Akahane, Okamoto et al. 2001; Liu, Pelekanakis et al. 2004; Jiang, Wang et al. 2011). Enfin, bien que l'apoptose des cellules endothéliales ne modifie pas l'expression du FT, elle favorise sa présence fonctionnelle en membrane. En effet, le FT, principalement contenu sous forme encrypté dans les cavéoles de la membrane plasmique, se trouve exposé à la circulation sanguine par la formation de micro-invaginations membranaires appelées microparticules (Eilertsen and Osterud 2004). Produites par les cellules endothéliales, les monocytes, les plaquettes et les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (Siddiqui, Desai et al. 2002; Kushak, Nestoridi et al. 2005; Moosbauer, Morgenstern et al. 2007), les microparticules sont de petits fragments de membranes porteuses de FT et libérés par ces cellules lorsqu'elles sont activées ou apoptotiques (Morel, Toti et al. 2006). Par leurs propriétés procoagulantes (Sturk-Maquelin, Nieuwland et al. 2003), ces microparticules sont impliqués dans les processus thrombotiques (Morel, Toti et al. 2006). De plus, l'interaction entre des microparticules d'origine monocyttaire et les cellules endothéliales et fibroblastiques induit la production de cytokines inflammatoires (IL6 et IL8) et de MMPs (MMP-1, -3 et -9) (Distler, Jungel et al. 2005).

### **1.5.2 Régulation négative.**

L'induction de l'expression du FT par les monocytes est rétro-contrôlée par les cytokines inflammatoires suivantes : l'IL4, l'IL13, l'IL10 et le TGF $\beta$  qui contrôlent également son activité procoagulante (Ernofsson, Tenno et al. 1996; Osnes, Foss et al. 1996; Kamimura, Viedt et al. 2005; Poitevin, Cochery-Nouvellon et al. 2007). *In vitro*, il a été montré que les acides gras polyinsaturés, présents notamment au niveau des plaques d'athérome où ils jouent un rôle stabilisateur et protecteur de la plaque, inhibent l'expression du FT par les monocytes (Norris, Weldon et al. 2006). Cette inhibition pourrait résulter de mécanismes indirects impliquant le TNF $\alpha$ , l'IL1 $\beta$  et le thromboxane A2 (Sanigorski, O'Dea et al. 1994; Chu, Raphael et al. 1999).

Le FT est exprimé à la surface cellulaire sous 2 formes : la forme encryptée et la forme dé-encryptée (Bach 2006). Proportionnellement, la forme encryptée est majoritaire bien que la forme dé-encryptée soit la seule à être fonctionnellement active. En effet, bien que ces 2 formes fixent le FVII avec la même affinité, seule la forme dé-encryptée peut induire la coagulation. Protégée de la dégradation enzymatique, la forme encryptée permet d'amplifier rapidement la réponse cellulaire face à un évènement nécessitant la présence fonctionnelle du FT. En effet, Il est plus rapide et efficace d'induire la migration des cavéoles contenant le FT vers la membrane cellulaire que de lever l'inhibition qui contrôle l'expression du FT. Les phosphatidylsérines (PS) présentes au sein de la membrane phospholipidique de manière asymétrique (présence accrue au niveau de la partie intra-cytosolique) seraient impliquées dans le mécanisme de dé-encryption du FT. En effet, il a été montré que l'ionophore calcique, puissant inducteur de l'externalisation des PS, accroît l'activité procoagulante du FT (Wolberg, Monroe et al. 1999; Henriksson, Klingenberg et al. 2007). Un modèle *in vitro* de bicouche phospholipidique reconstituée a permis de confirmer l'implication des PS dans le processus de dé-encryption du FT (Hathcock, Rusinova et al. 2006; Morrissey, Pureza et al. 2008).

## **1.6. Rôles du FT.**

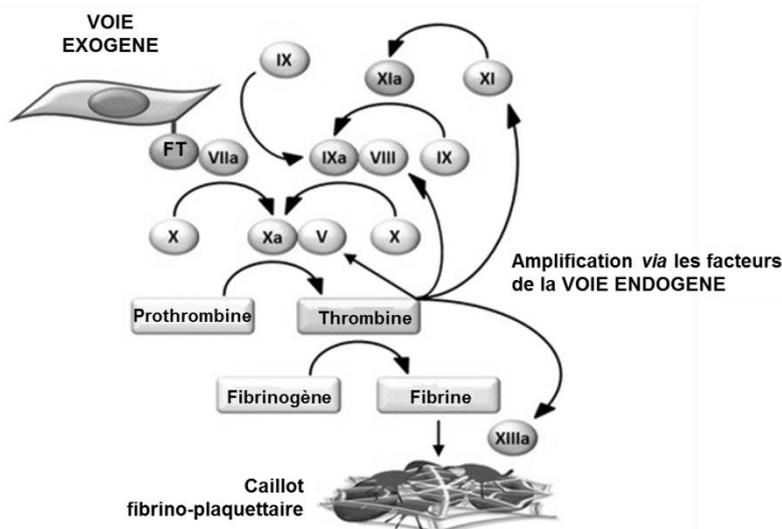
### **1.6.1 Dans le processus de coagulation.**

Essentiel au maintien de l'intégrité vasculaire, la coagulation sanguine résulte d'une cascade de réactions enzymatiques aboutissant à la génération de thrombine, enzyme responsable de l'activation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble qui constitue la

charpente du clou plaquettaire. Cette cascade dispose d'un tronc commun vers lequel convergent 2 voies d'activation : la voie endogène initiée par le contact du sang avec les structures sous-endothéliales et la voie exogène induite par une lésion tissulaire.

Auparavant considérée comme issue en part égale de ces 2 voies, la coagulation est désormais considérée comme un processus dynamique induit principalement par la voie exogène et, par conséquent, le FT (**Figure 23**).

Lorsque le tissu vasculaire est endommagé, la réaction inflammatoire locale active les cellules endothéliales qui expriment alors du FT tout comme les monocytes et les plaquettes recrutés. Désormais en contact avec les différents facteurs de la coagulation présent dans le plasma sanguin, le FT fixe le FVII qu'il active. Cette activation induit une cascade de réactions enzymatiques qui active consécutivement le FX et la prothrombine. La thrombine ainsi générée permet la formation du caillot fibrino-plaquettaire étanche par formation de fibrine insoluble constituant une charpente dans laquelle vont s'insérer des plaquettes (**Figure 23**). La voie endogène induite par le contact du sang avec la charge électro-négative de la lame basale complète cette initiation de la coagulation (Khan and James 1998; Kelley, Yang et al. 2004; Roberts, Monroe et al. 2004).

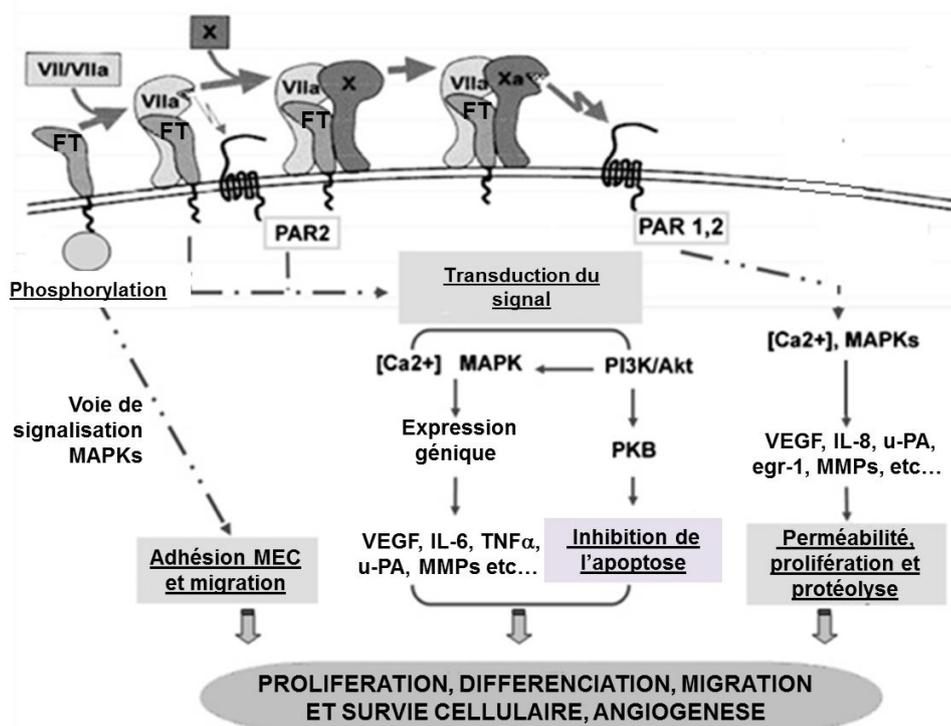


**Figure 23 :** Représentation schématique de la cascade enzymatique de la coagulation. D'après Ito 2014.

### 1.6.2 Dans la signalisation cellulaire.

Le complexe FT/FVIIa est capable d'initier de nombreuses voies de signalisation cellulaire *via* l'augmentation intracellulaire des flux calciques et l'activation de la phospholipase C (Cunningham, Romas et al. 1999). Il permet l'activation des voies de

signalisation cellulaire impliquées dans la prolifération, la différenciation, la migration et l'apoptose cellulaire tels que les voies ERK1/2, JNK, MAPKs et AKT par l'activation de certaines tyrosines kinases. L'apoptose est également régulée *via* l'activation de la voie des caspases et, plus précisément, par l'induction de la synthèse de BCLXL et l'activation de la protéine anti-apoptotique PKB (Sorensen, Rao et al. 2003; Cirillo, Cali et al. 2004; Versteeg, Spek et al. 2004; Ott, Weigand et al. 2005). Ce complexe stimule l'activation des facteurs de transcription Egr-1, AP-1 et STAT5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) (Poulsen, Jacobsen et al. 1998; Camerer, Rottingen et al. 1999; Versteeg, Spek et al. 2004). Enfin, il induit l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation comme l'IL6, l'IL8 et le TNF $\alpha$ , des gènes impliqués dans l'adhésion et la migration cellulaire comme VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) et l'angiogenèse comme le VEGF (**Figure 24**) (Abe, Shoji et al. 1999; Belting, Dorrell et al. 2004; Ryden, Grabau et al. 2010).



**Figure 24 : Représentation schématique de la signalisation cellulaire induite par le FT.**

D'après Lopez-Pedraza, Barbarroja et coll. 2006.

La signalisation dépendante du FT se fait par 2 voies distinctes : d'une part, *via* l'activité catalytique des complexes FT/FVIIa et FT/FVIIa/FXa et, d'autre part, *via* son domaine intracytoplasmique. Il a été démontré que ces 2 voies sont, bien que distinctes, étroitement liées (**Figure 24**).

Des études d'inhibition du domaine catalytique du complexe FT/FVIIa montre que l'activation de la voie ERK1/2, l'expression des gènes des cytokines et l'angiogenèse sont des réponses cellulaires induites par le FT de manière dépendante de son activité catalytique (**Figure 24**) (Poulsen, Jacobsen et al. 1998; Belting, Dorrell et al. 2004; Cirillo, Cali et al. 2004; Muth, Kreis et al. 2005). Ces réponses cellulaires sont médiées par le récepteur PAR2. En effet, comme montré au sein de lignées cellulaires cancéreuses, l'inhibition du récepteur PAR2 par un anticorps neutralisant, bloque la signalisation induite par le complexe FT/FVIIa (Hjortoe, Petersen et al. 2004; Albrektsen, Sorensen et al. 2007).

La signalisation médiée par le domaine intracytoplasmique est dépendante de la phosphorylation de ce domaine (**Figure 24**). En effet, cette phosphorylation favoriserait l'adoption d'une conformation structurale spécifique et nécessaire à cette signalisation (Sen, Herzik et al. 2009). Or, l'activation de PAR2 par le complexe FT/FVIIa induit la phosphorylation de ce domaine *via* la phospholipase C et la PCK $\alpha$  ; renforçant ainsi son rôle dans la signalisation cellulaire médié par le FT (Ahamed and Ruf 2004; Belting, Dorrell et al. 2004). Une étude sur la transfection de FT dépourvu de domaine intracytoplasmique dans des cellules tumorales, montre que la signalisation induite par la phosphorylation de ce domaine est nécessaire à l'expression de VEGF (Abe, Shoji et al. 1999). Enfin, la présence d'antigène de surface tel que VCAM-1 impliqué dans l'adhésion cellulaire des cellules cancéreuses est également initiée par le domaine intracytoplasmique du FT (Li, Collier et al. 2008).

### 1.6.3 Dans la migration cellulaire et l'angiogenèse.

La fibrine produite consécutivement à l'activation de la cascade de coagulation est impliquée dans la migration cellulaire et la libération de facteurs régulant l'angiogenèse (**Figure 24**) (Carmeliet and Jain 2000). L'hémostase, la migration cellulaire et l'angiogenèse sont donc étroitement liées.

La migration cellulaire est induite par le domaine intracytoplasmique du FT *via* l'activation de Rac1 et de p38 (Ott, Weigand et al. 2005). Le FT est un facteur de chimiotactisme aussi puissant que le PDGF pour les CMLs. En effet, la migration de ces cellules est bloquée dès lors que le FT est inhibé (Sato, Asada et al. 1996). Néanmoins, dans ce cas de figure, la liaison du FT avec le FVIIa est nécessaire bien qu'indépendant du FXa et

de la thrombine (Siegbahn, Johnell et al. 2000).

Il a tout d'abord été montré que le déficit total en FT n'était pas viable puisque les embryons de souris  $mFT^{-/-}$  meurent *in utero* à 10,5 jours de développement suite à des hémorragies et présentent une désorganisation importante de la vascularisation du sac vitellin. Ceci serait issu d'un défaut dans la réalisation de la structure des vaisseaux sanguins et, plus particulièrement, de la couche musculaire de ces vaisseaux. Le FT, *via* son domaine intracytoplasmique, semble davantage impliquer dans la structuration des vaisseaux sanguins que dans la régulation de la différenciation des cellules endothéliales (Zhang, Deng et al. 1994; Bugge, Xiao et al. 1996; Carmeliet, Mackman et al. 1996; Carmeliet and Jain 2000). Comme pour la migration cellulaire, l'induction de l'angiogenèse nécessite la liaison du FT avec le FVIIa mais ne dépend pas nécessairement de l'activité enzymatique du FXa puisque le FT est encore capable d'induire l'angiogenèse bien après l'inhibition de la coagulation (Hembrough, Swartz et al. 2003). Néanmoins, le FXa amplifie l'angiogenèse puisqu'il stimule fortement la libération de cytokines pro-angiogéniques et pro-inflammatoires comme l'IL6 et l'IL8 (Daubie, Cauwenberghs et al. 2006). Enfin, il a été montré que, dans certaines tumeurs (fibrosarcome, adénocarcinome gastrique et mélanome), l'expression du FT est associée, d'une part, à la réduction de la transcription de la thrombospondine, protéine anti-angiogénique, et l'amplification de celle du VEGF (Zhang, Deng et al. 1994; Abe, Shoji et al. 1999; Zhang, Ding et al. 2005). De plus, il a été montré que le FT et le VEGF s'induisent mutuellement puisque la stimulation du complexe FT/FVIIa dans des fibroblastes induit une expression accrue de VEGF et que le VEGF exprimé induit l'expression de FT par la cellule endothéliale *via* Egr-1 (**Figure 22**) (Mechtcheriakova, Wlachos et al. 1999; Ollivier, Chabbat et al. 2000; Chen, Bierhaus et al. 2001).

#### 1.6.4 Dans la fibrose.

En condition physiologique, la présence d'une brèche tissulaire induit la cascade de coagulation médiée par le FT qui permet de refermer rapidement cette brèche par la formation d'un clou fibrinoplaquettaire. Dans le même temps, les cytokines inflammatoires sécrétées par les cellules inflammatoires recrutées au site de lésion induit la migration cellulaire des fibroblastes et/ou des CMLs sous-jacents et stimulent la sécrétion de collagène par ces cellules *via* l'activation des récepteurs PAR1 (**Figure 24**). Les cellules inflammatoires expriment ensuite les activateurs du plasminogène, le t-PA et l'u-PA, qui

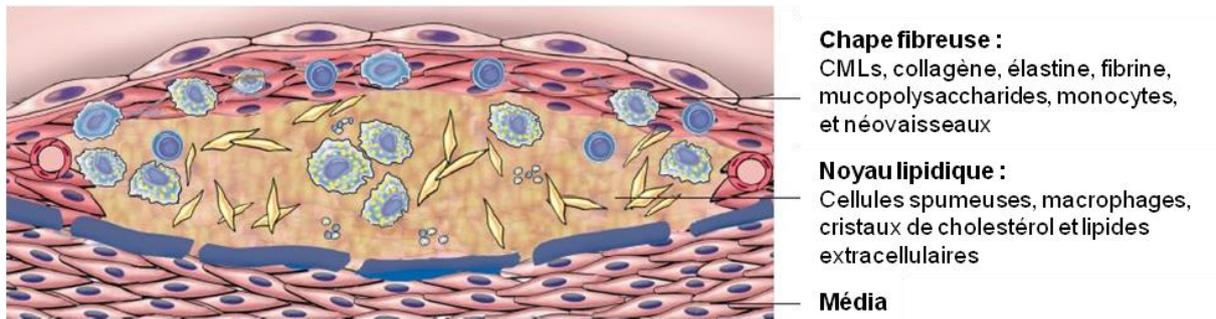
génèrent de la plasmine qui dégrade alors la fibrine qui sera remplacée par le collagène (Dvorak 1986).

Néanmoins, il a été montré qu'une génération incontrôlée de thrombine induite par une surexpression du FT a pour conséquences une prolifération cellulaire des fibroblastes plus importante avec différenciation cellulaire en myofibroblastes et synthèse de collagène accrue (Trejo, Connolly et al. 1996; Chambers, Dabbagh et al. 1998; Bogatkevich, Tourkina et al. 2001). De plus, il a été montré dans des fibroblastes pulmonaires et des cellules épithéliales en culture que l'activation de PAR1 induisait rapidement l'expression d'un facteur de croissance du tissu conjonctif, le CTGF (*connective tissue growth factor*). Ce facteur de croissance est impliqué dans les processus de fibrose car, d'une part, son domaine N-terminal induit la différenciation myofibroblastique et, d'autre part, son domaine C-terminal induit la prolifération fibroblastique (Chambers, Leoni et al. 2000; Riewald, Kravchenko et al. 2001; Grotendorst and Duncan 2005). Enfin, il a été montré que l'activation du récepteur PAR1 des cellules épithéliales permettait l'activation du plus puissant médiateur pro-fibrotique : le TGF $\beta$  (Jenkins, Su et al. 2006).

## **2. FT et athérosclérose.**

### **2.1. Rappel sur l'athérosclérose.**

La plaque d'athérosclérose est constituée d'un noyau lipidique (appelé également core lipidique ou encore athérome) recouvert d'une armature fibreuse sclérosée appelée tissu fibreux (ou chape fibreuse). Composé de CMLs, de collagène, d'élastine, de fibrine et de mucopolysaccharides, ce tissu fibreux délimite la plaque athéroscléreuse de la média saine et de l'endothélium. Le noyau lipidique est, quant à lui, composé d'un tissu mou contenant des cellules spumeuses issues de macrophages ayant phagocyté des LDLs et des lipides extracellulaires (**Figure 25**) (Rekhter and Gordon 1995).



**Figure 25 : Représentation schématique de la plaque d'athérosclérose et de ses constituants.**

D'après le dessin présenté par l'Université Numérique Francophone des Sciences de la Santé et du Sport [en ligne].

[http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath\\_4/site/html/4.html](http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_4/site/html/4.html)

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique (Ross 1999; Hansson 2005). En effet, l'intrusion de LDLs au sein de la média des artères de moyen et gros calibre induit la transmigration de monocytes qui initie une réaction inflammatoire locale afin de protéger l'intégrité du tissu vasculaire. Dans ce but, les monocytes se différencient en macrophages capable de phagocyter ces LDLs qui, progressivement, deviennent des cellules spumeuses suite au stockage interne massif de lipides. Ces cellules convertissent les LDLs en LDLs oxydés et secrètent de nombreux éléments mitogéniques et chimioattractants tels que l'IL1 $\beta$  et des cristaux de cholestérol qui renforcent la réaction inflammatoire mais, également, la migration de CMLs présentes au sein de la média et la formation du tissu fibreux (Libby 2002; Tedgui and Mallat 2006; Moore and Tabas 2011). Le noyau lipidique est formé par l'apoptose des cellules spumeuses qui libèrent les lipides caractéristiques de ce noyau mais également les cristaux de cholestérol capables d'évoluer en calcifications. Le tissu fibreux est synthétisé par les CMLs recrutées au site de lésion afin d'isoler le noyau lipidique du tissu sain. L'épaississement de la paroi vasculaire ne permettant plus l'approvisionnement passif des cellules en nutriments et oxygène, les cellules en souffrance secrètent du VEGF et diverses MMPs afin d'initier l'angiogenèse (Hansson 2005; Borensztajn, Peppelenbosch et al. 2008). Inflammation, fibrose, angiogenèse et calcification caractérisent ainsi l'athérosclérose.

## **2.2. Implication du FT dans la pathologie athéroscléreuse.**

La présence du FT au sein de lésions athéroscléreuses a été mise en évidence pour la première fois en 1989 par Wilcox *et al.* (Wilcox, Smith et al. 1989). L'ARNm et la protéine du FT sont colocalisés avec les macrophages et les cellules spumeuses, adjacentes aux zones riches en cholestérol et à l'intérieur de noyaux nécrotiques contenus dans la lésion

athéroscléreuse. Par la suite, il a été montré que le FVII est colocalisé avec le FT au niveau des macrophages et des CMLs alors que le FX est associé aux zones riches en cholestérol et dans l'ECM de la lésion (Wilcox, Noguchi et al. 2003). Les protéines de la coagulation ont ensuite été mises en évidence au sein de la plaque d'athérosclérose en colocalisation avec le FT, le FVII et le FX et à proximité des macrophages et des CMLs. Enfin, la mise en évidence de la présence de fibrine induite par la cascade de coagulation et de ses produits de dégradation (D-dimères) produits par la plasmine au sein de ces plaques a permis de suggérer que le FT et la coagulation étaient impliqués dans le développement de l'athérosclérose (Bini, Fenoglio et al. 1989; Smith, Keen et al. 1990).

L'implication du FT dans le développement de l'athérosclérose est précoce puisque la présence de fibrinogène a été mise en évidence au sein de stries lipidiques, phase précoce de l'athérosclérose initiée dès l'enfance, présentes au niveau de l'intima artériel (Khrenov, Ananyeva et al. 2002). Le FT est impliqué directement ou indirectement dans différents processus impliqués dans le développement de l'athérosclérose tels que la perturbation de la barrière endothéliale, l'initiation du stress oxydant, le recrutement de leucocytes, l'initiation de l'inflammation, la migration et la prolifération de CMLs, l'apoptose cellulaire et l'angiogenèse. Cette implication est induite *via* la cascade de coagulation et *via* la signalisation induite soit par le complexe FT/FVIIa, soit par l'activation des récepteurs PARs induite par ce complexe (Ossovskaya and Bunnett 2004; Borissoff, Heeneman et al. 2010). Le complexe FT/FVIIa est capable d'induire de nombreuses voies de signalisation cellulaire, induite directement ou *via* PAR2, impliquées, dans le cadre de l'athérosclérose, dans le chimiotactisme des monocytes et des fibroblastes (chemokine ligand 2 (CCL2), dans l'inflammation (IL6 et IL8), la migration et la prolifération des CMLs (PDGF et TGF $\beta$ ), l'angiogenèse (VEGF), l'induction du stress oxydant et l'apoptose cellulaire (Sorensen, Rao et al. 2003; Zhang, Ding et al. 2005; Monroe and Key 2007; Borensztajn, Peppelenbosch et al. 2008; Borissoff, Spronk et al. 2011).

Au sein de notre équipe, il a été montré qu'un régime faible en lipides permettait, dans un modèle expérimental d'athérosclérose chez le lapin, de réduire le potentiel athérothrombotique des plaques par une expression du FT diminuée. De plus, la présence du FT était positivement associée avec l'angiogenèse présente dans ces plaques (Jeanpierre, Le Tourneau et al. 2003). De plus, dans ce même modèle, l'administration de fibrates, médicament capable de moduler le métabolisme des lipides et l'inflammation réduit

significativement l'expression du FT au sein de la plaque et sa réendothélialisation (Jeanpierre, Le Tourneau et al. 2009). Enfin, notre laboratoire montré à partir de plaques carotidienne humaine que la dyslipidémie, définie comme l'élévation du ratio apolipoprotéine B sur apolipoprotéine A1, était associée à un déséquilibre de la balance FT/TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*) en faveur du FT augmentant ainsi le potentiel thrombotique de la plaque (Zawadzki, Susen et al. 2007). Notre équipe a également montré que le TFPI2, autre inhibiteur du FT, était également diminué au sein de plaques carotidiennes humaines par méthylation de son gène (Zawadzki, Chatelain et al. 2009).

### **3. Implication du FT dans la Sao.**

La Sao étant décrite comme une pathologie « *atherosclerosis-like* », l'hypothèse de l'implication du FT dans sa physiopathologie a été naturellement posée. Otto et coll. ont montré dès 1994 que les patients atteints de Sao présentaient un risque accru d'évènements cardiovasculaires thromboemboliques qui n'étaient apparemment pas associés à une fibrillation atriale ou à une athérosclérose concomitante (Otto, Kuusisto et al. 1994; Otto, Lind et al. 1999). La présence de FT a été rapportée pour la première fois en 2009 dans un modèle de sclérose de la valve aortique chez le lapin (Marechaux, Corseaux et al. 2009). L'antigène FT a été identifié au niveau des lésions valvulaires présentes au niveau de la face aortique avec une expression 3 fois supérieure à celle des valves contrôles. L'expression du FT était associée à une infiltration macrophagique massive. Depuis, la présence de FT a été rapportée au sein de valves aortiques de patients souffrant de Sao modérée à sévère et qui ne présentaient pas, simultanément, d'athérosclérose ou de pathologie coronaire (Natorska, Marek et al. 2009). Dans cette étude, il a été montré que la sévérité de la Sao était positivement associée avec l'expression intravalvulaire du FT. Dans ces travaux chez l'homme ou l'animal, le FT a aussi été mis en évidence par immunomarquage dans des zones dépourvues de macrophages suggérant que les VICs pourraient également produire du FT (Marechaux, Corseaux et al. 2009; Natorska, Marek et al. 2009).

Le FT serait plus particulièrement impliqué dans le processus de calcification puisque nous avons montré que les zones de calcifications présentes au sein de valves sténosées présentaient une expression importante de FT colocalisé avec l'ostéopontine, protéine impliquée dans la différenciation ostéogénique, la thrombine et la phosphatase alcaline (Breyne, Juthier et al. 2010). La thrombine générée par le FT est capable de cliver le

fragment N-terminal de l'ostéopontine qui possède des propriétés pro-calcifiantes et pro-inflammatoires et favoriserait donc la différenciation ostéogénique (Rajamannan, Subramaniam et al. 2003). De plus, au sein de valves sténosées humaines, le FT était colocalisé avec les dépôts de calcium présents dans les zones de calcification (Breyne, Juthier et al. 2010). Le FT pourrait également être impliqué dans le processus d'angiogenèse puisqu'il a été montré que la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la valve sténosée était associée à l'expression de VEGF qui est significativement plus exprimé au niveau des zones de calcifications (Breyne, Juthier et al. 2010).

Enfin, la présence de fibrine a été observée au sein de valves aortiques sténosées que ce soit au niveau de la face aortique ou dans la valve (Natorska, Marek et al. 2011). Il existe, par ailleurs, une corrélation positive entre la présence de fibrine au sein de la valve sténosée et le gradient transvalvulaire de patients atteints de Sao non associée à une pathologie coronaire. De nombreuses études montrent que la régulation de la synthèse et de la dégradation de la fibrine au sein de la valve sténosée est impliquée dans la progression de la Sao. En effet, il a été montré que 69 % des cellules valvulaires issues de valves de personnes atteintes de Sao produisent un taux élevé de PAII, d'u-PA et de t-PA (Kochtebane, Alzahrani et al. 2014). De plus, il a été montré que les patients avec une hypofibrinolyse présentaient un épaissement valvulaire plus important car ces valves contiennent une couche de fibrine plus épaisse et davantage de dépôts de calcium (Wypasek, Natorska et al. 2013) Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre l'hypofibrinolyse et la surface valvulaire fonctionnelle.

## OBJECTIFS

Composante cellulaire prédominante des valves aortiques, les VICs jouent un rôle crucial dans le développement de la Sao. La culture primaire de ces cellules est, par conséquent, fréquemment utilisée afin d'élucider les mécanismes précis de leur implication dans la progression de cette pathologie. Ces cellules présentent une importante plasticité avec 4 sous-phénotypes décrits : pVICs résidents et hématopoïétiques, qVICs, aVICs et obVICs. En dépit de la connaissance de cette plasticité, la culture primaire de ces cellules a, jusqu'à présent, été caractérisé uniquement sur les caractéristiques myofibroblastiques des qVICs et aVICs. Identifiées en post-digestion, le devenir des pVICs et des obVICs en culture était inconnue.

Principal initiateur de la cascade de coagulation, le FT a été mis en évidence au sein de valves sténosées humaines conjointement avec les macrophages mais également avec les VICs. Connu pour être impliqué dans l'athéro-thrombogénicité des plaques d'athérosclérose, le FT est également connu pour sa capacité à induire différentes voies de signalisation impliquées dans différents processus également rencontrés lors du développement de la Sao : la fibrose et la formation de calcifications.

Les objectifs de notre travail étaient donc :

- d'une part, de caractériser les VICs en culture primaire sur les supports les plus fréquemment utilisés (plastique et collagène) en réalisant une étude longitudinale depuis les valves aortiques humaines contrôles et fibrocalcifiées, en post-digestion jusqu'à la culture.
- d'autre part, d'étudier l'expression constitutive du FT par les VICs issues de valves aortiques humaines contrôles et fibrocalcifiées, d'analyser sa possible induction par une cytokine inflammatoire fortement présente au sein des valves pathologiques (IL1 $\beta$ ) et d'identifier si, en présence de son ligand naturel (FVII), le FT est impliqué dans les processus de fibrose et de calcification.

## ARTICLES

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis la réalisation de 2 manuscrits, actuellement ou prochainement, soumis à des journaux avec révision par les pairs. Le premier manuscrit intitulé « *From human aortic valves to valvular interstitial cells: in vitro behavior and cell subpopulation discrimination.* » est actuellement en révision dans le journal *PLOS ONE* et est présenté ici dans sa version soumise à l'éditeur. Le second manuscrit est une *short communication* destinée au journal *Atherosclerosis* et est présenté dans sa version prochainement soumise. Dans cette thèse, des résultats préliminaires complète cette communication et devront être confirmés avant soumission.

**I. From human aortic valves to valvular interstitial cells: *in vitro* behavior and cell subpopulation discrimination.**

Anaïs Arbesu Y Miar, MSc<sup>1</sup>, Antoine Rauch, MD, PhD<sup>1</sup>, Rodrigo Lorenzi, PhD<sup>1</sup>, Francis Juthier, MD, PhD<sup>1,2</sup>, André Vincentelli, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Ramadan Jashari, MD<sup>3</sup>, Mickael Rosa, MSc<sup>1</sup>, Annabelle Dupont, pharmD, PhD<sup>1</sup>, Bart Staels, pharmD, PhD<sup>1</sup>, Eric Van Belle, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Sophie Susen, MD, PhD<sup>1</sup> and Delphine Corseaux, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011, EGID, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> Cardiology Department of Lille University Hospital, Lille, France

<sup>3</sup> European Homograft Bank, Brussels, Belgium

**Corresponding author:**

Delphine Corseaux, Inserm UMR 1011, Medicine Faculty – Research Pole – J&K; Boulevard du Professeur Jules Leclercq; 59045 Lille Cedex – France. Telephone and fax number: +33 320.62.35.70. E-mail: delphine.corseaux@univ-lille1.fr.

## ABSTRACT

**Background:** Valvular interstitial cells (VICs), the predominant cell type in aortic valves, display an important plasticity. Primary culture of human VICs is often used to study the pathophysiology of aortic stenosis. However, only the (myo)fibroblastic characteristic is used to identify VICs regardless the existence of progenitor and osteoblastic VICs subpopulations. Thus, the aim of this study was to discriminate VICs subpopulations from human control and fibrocalcified aortic valves with referred markers *ex vivo*, after isolation and during culture on plastic or collagen.

**Methods:** *Ex vivo* characterization was performed by immunohistology. After collagenase digestion, VICs were cultured on plastic or collagen from third to fifth passages. Flow cytometry was used to define VICs phenotypes with different markers: vimentin,  $\alpha$ -smooth muscle actin, stage-specific embryonic antigen 4, CD34, CD90, neural/glial antigen 2, HSP47, osteoblast cadherin and osteomodulin.

**Results:** All VICs subpopulations were found with different localizations and proportions in human control and fibrocalcified aortic valves. After isolation, these subpopulations were preserved with differences between control and fibrocalcific VICs. In culture, control and fibrocalcific VICs had a different proliferative profile with more stability for control VICs than fibrocalcific ones. Progenitor fibrocalcific VICs were halved in favor of an osteoblastic profile. Moreover, both supports induced VICs activation and osteoblastic differentiation but collagen stabilized the progenitor population.

**Conclusion:** Primary culture of human VICs constitutes a good model to study cell mechanisms of aortic stenosis. Nevertheless the VICs plasticity has to be taken into account during the design of experimental groups.

## INTRODUCTION

Affecting 2 to 6% of the population over 65 years, aortic valve stenosis (AS) is the main valvular pathology in western countries [1]. AS is a multifactorial atherosclerosis-like disease characterized by inflammation, neo-angiogenesis, fibrosis and calcification. Intrusion and oxidation of low density lipoproteins, extensive extracellular matrix (ECM) remodeling and osteoblast-like cells characterize AS [2-5]. Despite extensive research, AS pathogenic processes remain unclear and the only treatment is surgical replacement.

As prevalent cell type within the valve, valvular interstitial cells (VICs) have a critical role in AS development [6,7]. Liu et al. described a few years ago that this heterogeneous cell population presents five identifiable phenotypes: embryonic progenitor cells (EPCs), progenitor (pVICs), quiescent (qVICs), activated (aVICs) and osteoblastic (obVICs) VICs [6]. During embryogenesis, EPCs derived from endocardial cells by endothelial mesenchymal transition (EndMT) permit the cellularization of the valve by qVICs [8] which ensure the physiological valve structure through very low-grade ECM turn-over [6]. It is suggested that resident pVICs contribute to the maintenance of qVICs population [6]. Hematopoietic pVICs, recruited into the valve from bone-marrow or blood, participate in angiogenic processes and osteoblastic differentiation [9,10]. In case of injury, inflammation and associated cytokines activate qVICs and the generated aVICs greatly contribute to valve fibrosis and hyperplasia. Finally, in the presence of bone morphogenic proteins and transforming growth factor- $\beta$ , aVICs differentiate into obVICs that contribute to valve calcification [11,12]. Although described, the study of these subpopulations together *ex vivo*, on post-digestion and in primary culture, has never been performed.

The development of therapeutic alternatives to valve replacement is hampered by the still poor understanding of the pathophysiological mechanisms of AS and the precise role of the different cell types involved. In this scenario, VICs in vitro culture remains one of the most reliable tools to elucidate such mechanisms. These cells are often isolated by collagenase digestion from stenotic human valves or porcine valves that are used as controls. It is so because the access to human control valves is relatively rare.

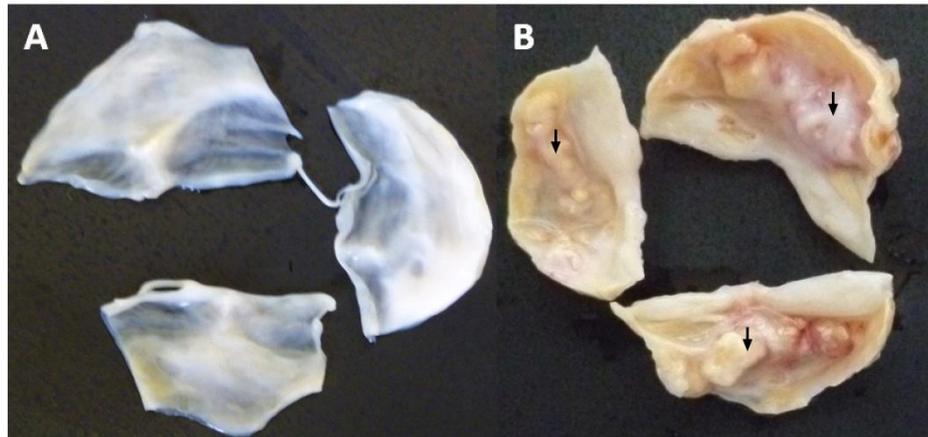
Generally, VICs phenotypes are assessed only in respect to the myofibroblastic activity, by measuring vimentin and/or  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) expression [6] regardless of progenitor and osteoblastic VICs subpopulations. Recently, Wang et al. have identified progenitor markers (ATP-binding cassette, sub-family G, member 2, stage-specific embryonic antigen 4 (SSEA4) and Neural/Glial antigen 2 (NG2)) in cells isolated from porcine aortic valves that they referred to as pVICs [13]. Experiments are often performed between 3-6 passages, neglecting cell susceptibility to culture conditions, which may activate or (de)differentiate them. Therefore, a better and efficient characterization of VICs phenotypes and their behavior *in vitro* is crucial for the design and interpretation of experiments. The objective of this study was to clearly define VICs subpopulations from human control and fibrocalcified aortic valves *ex vivo*, on post-digestion and during culture performed on plastic or collagen.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study population and human aortic valve collection**

Nine consecutive control valves were collected from human organ donors excluded of a transplantation protocol, at the European Homograft Bank (Brussels, Belgium). After explantation, valves were transported to the laboratory in ice-cold Smooth Muscle Cell (SMC) Growth Medium 2 (Promocell, Heidelberg, Germany). None of the donors presented valvular disease and all valves were thin, translucent, flexible and non-calcified (**Fig 1A**).

Nine fibrocalcific valves were obtained from patients undergoing surgical aortic valve replacement for severe AS at our institution (CHU Lille, France). Rheumatic and bicuspid aortic valves were excluded. Diagnosis was made by echography according to guidelines of the European Society of Cardiology. These valves were calcified, thickened, vascularized and presented lipid deposits (**Fig 1B**).



**Figure 1: Macroscopic morphology of aortic valves.** Control valves (**A**) are thin and pliable without macroscopic calcifications while fibrocalcific valves (**B**) are opaque and highly calcified. Legend: arrows: calcifications.

Male gender was predominant in both groups (70%). As expected, the average age of the population was significantly different between both groups (mean of control: 54.3 years (39-76) and mean of fibrocalcified AS: 73.5 years (63-84,  $p=0.0007$ ).

The investigations were conducted according to the Declaration of Helsinki and approved by the local institutional review board and ethics committee of the CHU Lille (CPP n° 2008\_13/0839). All patients gave an informed consent. One leaflet was placed in embedding molds with OCT Embedding Matrix (CellPath, Powys, UK). Valve freezing was carried out in liquid nitrogen-cooled isopentane. Frozen blocks were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until needed. Second and third leaflets were dedicated to VICs culture analysis. The three leaflets of three control and fibrocalcified valves were used to post-digestion analysis.

### **Immunohistological staining**

Serial  $7\ \mu\text{m}$  sections were made onto Superfrost slides (ThermoFisher Scientific, MA, USA) and fixed in 10% formalin solution (Sigma Aldrich, MO, USA) at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes. Sections were washed with PBS (Life Technology, CA, USA), blocked in PBS with decomplexed normal serum and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with a primary antibody (**Table 1**). Sections were then washed with PBS and incubated with the corresponding secondary antibody (anti-mouse: A11062, anti-rabbit: A11012; Life Technology) conjugated to the fluorescent probe AlexaFluor 594 (1 h at  $4^{\circ}\text{C}$ ). Sections were counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich) for cell nuclei. Appropriate non-immune IgGs served as negative

controls. Slides were mounted in glycerol-PBS mixture (v/v; glycerol approx. 99% GC, Sigma-Aldrich). CD34 revelation was established by the institute of pathology of Centre de Biologie Pathologie Pierre-Marie Degand (CHU Lille) on Ventana Benchmark XT automated system (Roche, Bale, Switzerland). CC1 pretreatment lasted 30 minutes and tissues incubated with primary antibody during 32 minutes at 37°C. Images were acquired using Leica DMI6000B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The histological analyses were performed using ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA). Calcified areas and total valvular areas were identified with the Freehand Selection Tool and quantified with the Measure Tool. Proportions of valvular calcification were obtained by the ratio of the calcified area to total valvular area and expressed on percentage. Positive staining areas were isolated with the Color Threshold Tool and quantified with the Measure Tool. The proportion of the positive staining was determined by the ratio of positive staining area to the total valvular area and expressed on percentage.

	Marker	Cell type(s) marked	VIC phenotype	Antibody	Histology dilution
Membrane	SSEA4	Embryonic stem cells [13,14]	Resident pVICs	MC813 clone, ab16287 (Abcam, Cambridge, England)	1/250
	CD34	Hematopoietic stem cells [15]	Hematopoietic pVICs	IM0786 (histology) IM2472 (flow cytometry) clones, (Beckman Coulter)	1/150
	NG2	Oligodendrocytes, pericytes and progenitor cells [14,16]	Subpopulation progenitor cells	Mouse monoclonal ab83508 (Abcam)	1/50
	CD90	(Myo)fibroblasts, activated endothelial cells and various stem cells [17-19]	aVICs	5E10 clone, Cat. 555595 (BD Biosciences, NJ, USA)	1/50
Cytoplasmic	OB-CDH	Smooth muscle cells and osteoblast cells [14,20-23]	Osteoblast precursors	Rabbit polyclonal ab151302 (Abcam)	1/200
	HSP47	Embryonic stem cell in osteogenic differentiation [21-23]	Osteoblast precursors	Mouse monoclonal ab54874 (Abcam)	1/50
	OMD	Osteoblasts and odontoblasts [24,25]	obVICs	Rabbit polyclonal ab154249 (Abcam)	1/50
	Vimentin	Cells of mesenchymal origin [6,7]	qVICs / aVICs	V9 clone, M0725 (DakoCytomation, Copenhagen, Denmark)	1/250
	$\alpha$ SMA	Myofibroblasts [6;7,23]	aVICs	A SM-1 clone, CBL171 (Merck Millipore; Darmstadt, Germany)	1/500

SSEA4: stage specific embryonic antigen 4, CD34: Cluster of differentiation 34, NG2: neural/glial antigen 2, CD90: cluster of differentiation 90, OB-CDH: osteoblast cadherin, HSP47: heat shock protein 47, OMD: osteomodulin and  $\alpha$ SMA: alpha smooth muscle actin

## VICs isolation and primary culture

For fibrocalcified valves, VICs were isolated from the macroscopically non-calcified parts of each valve by collagenase digestion (type I, 0.3%, 1h at 37°C, Life technology). Cultures were performed in supplemented SMC Growth Medium 2 (5% FCS, Promocell) directly on plastic or on collagen-coated (10 µg/cm<sup>2</sup>, C8919, BD Biosciences) culture flasks (25 cm<sup>2</sup> – 75 cm<sup>2</sup>; BD Biosciences). Passages 3 (P3) to 5 (P5) were used for the experiments described herein. Viability and cell proliferation in standard medium were studied in triplicate in 96-well microplates with 10000 and 5000 cells/well, respectively. These analyses were made, respectively, by propidium iodide staining (Sigma-Aldrich) coupled with flow cytometry analysis and CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, WI, USA) after 48 h incubation.

## Flow cytometry

The presence of endothelial cells and blood cells (monocytes, macrophages and polymorphonuclear cells (PMN)) was determined after digestion with fluorochrome-conjugated antibodies against CD31 (Cat.555445; BD Biosciences), CD14 (A077764; Beckman Coulter, CA, USA), CD18 (IM1570U; Beckman Coulter), and CD45 (Cat.555484; BD Biosciences). In addition, the VICs markers presented in **Table 1** were analyzed. Cultured VICs (P3 to P5), were trypsinized (0.05%, 1 minute at 37°C; Life Technologies) and centrifugated (300 G for 10 minutes), to be further distributed into tubes (50000 cells into 100 µL PBS). For intracellular markers, VICs were permeabilized according to BD Cytotfix/Cytoperm™ fixation/permeabilization Kit protocol (BD Biosciences). VICs were incubated with primary human antibodies for 15 minutes at room temperature (dilution: 1/20). After washing and centrifugation, AlexaFluor488 / AlexaFluor594-conjugated secondary antibodies were added and incubated, in darkness, for 15 minutes at room temperature (anti-mouse: A11001, anti-rabbit: A11012; Life Technology). Data were acquired on a BD FACSCanto II (BD Biosciences) and analyzed using the BD FACSDiva software (BD Biosciences).

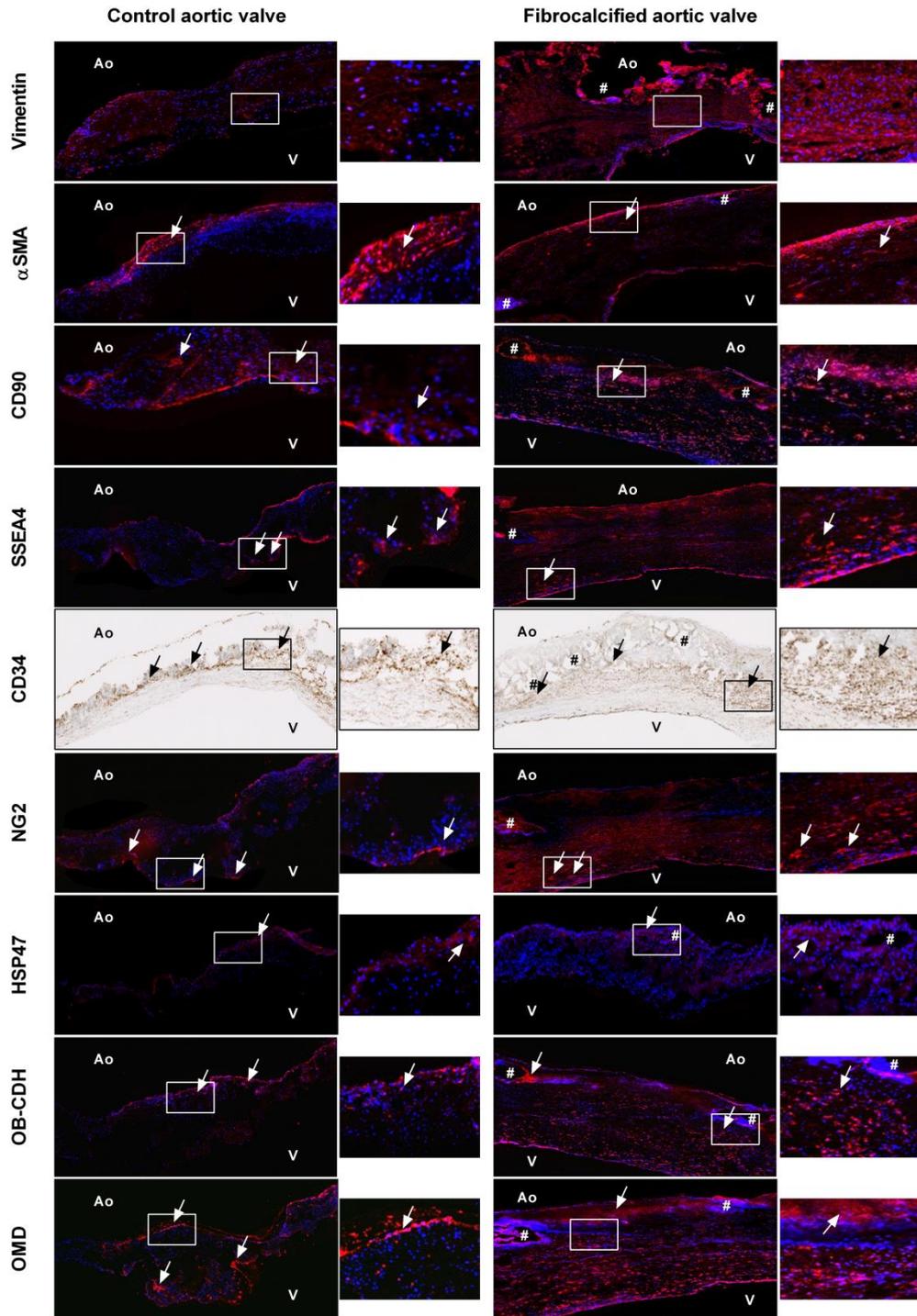
### **Statistical analysis**

Data are presented as mean  $\pm$  SEM for all analyses. Unpaired t-tests were used to evaluate statistical differences. A p value of  $< 0.05$  was considered statistically significant.

## **RESULTS**

### **All VICs subpopulations are present into control and fibrocalcified valves**

Histologically, control aortic valves were thin, without calcification and showed a preserved histological architecture. Fibrocalcified aortic valves were, on average,  $28 \pm 6$  % thicker than control aortic valves with a cell proportion two times more important. They showed a histological architecture disturbed by the presence of calcifications that represented, on average,  $8.5 \pm 2.6$  % of total valvular area (**Fig 2**).



**Figure 2: Immunofluorescent staining of each VICs marker in representative pictures of the control and fibrocalcified aortic valves.** Studied cell protein markers are highlighted in red and counter-staining was performed with DAPI. The principal figures pictures were realized with a x20 magnification and the zoomed pictures were performed with x100 magnification. Legend: Ao: aortic side – V: ventricular side – #: calcification – arrow: important spot.

As presented in **Table 1**, we studied the expression of 9 potential markers of VICs subpopulations. Histological results are reported in **Table 2**. Vimentin staining, the traditional marker of qVICs and aVICs, showed a disseminated presence of these cells within both control and fibrocalcified valves in a proportion of, respectively,  $24 \pm 0.3\%$  and  $32 \pm 4\%$  ( $p=0.1$ ). Staining of  $\alpha$ SMA, an aVICs marker, was strongly present in the fibrosa of control and fibrocalcified valves with wide distribution across the latter in a proportion of, respectively,  $9 \pm 2\%$  and  $27 \pm 3\%$  ( $p=0.008$ ). As a marker of (myo)fibroblasts, activated endothelial cells and various stem cells, CD90 localization was similar to that of  $\alpha$ SMA as well as its proportion (control aortic valve:  $8.5 \pm 1\%$  and fibrocalcified aortic valve:  $20 \pm 6\%$ ,  $p=0.1$ ). Used to characterize embryonic stem cells and undifferentiated cells like resident pVICs, SSEA4 staining showed a niche localized on the ventricular side of control valves but was disseminated within fibrocalcified valves in a proportion of, respectively,  $3 \pm 1\%$  and  $5 \pm 2\%$  ( $p=0.5$ ). Used to identify hematopoietic progenitor stem cells like hematopoietic pVICs, CD34 staining was located in the spongiosa of control and fibrocalcified valves but differed in their proportions (respectively,  $10 \pm 2\%$  and  $16 \pm 4\%$ ,  $p=0.3$ ). NG2, which identifies multipotent progenitor cells like subendothelial progenitor cells, was present near the endothelium of control valves, while it was disseminated in fibrocalcified valves, particularly in the ventricularis. The proportions were of, respectively,  $4 \pm 1\%$  and  $5 \pm 1\%$  ( $p=0.6$ ). Osteoblast precursors, identified by Heat Shock Protein 47 (HSP47) and Osteoblast CaDHerin (OB-CDH), were discrete in control valves ( $3 \pm 1\%$  and  $3 \pm 0.2\%$ , respectively). Their proportions were higher in fibrocalcified valves,  $6 \pm 1.5\%$  ( $p=0.2$ ) and  $6 \pm 0.5\%$  ( $p=0.007$ ), respectively. Moreover, HSP47+ and OB-CDH+ cells were disseminated, often colocalizing with calcification nodules. Finally, identified by osteomodulin (OMD), obVICs were scarcely observed in control valves ( $1.2 \pm 0.2\%$ ). In fibrocalcified valves, obVICs were significantly numerous ( $13 \pm 3\%$  ( $p=0.02$ )) and colocalized with calcifications. Moreover, this staining revealed the massive presence of extracellular OMD in the fibrosa.

	Control VICs		Fibrocalcific VICs	
	<i>Ex vivo</i>	Post-digestion	<i>Ex vivo</i>	Post-digestion
Vimentin + (%)	24 ± 0.3	84 ± 0.9	32 ± 4	50 ± 6
α-SMA+ (%)	9 ± 2	10 ± 0.9	27 ± 3	22 ± 4
CD90+ (%)	8.5 ± 1	8 ± 1	20 ± 6	19 ± 6
SSEA4+ (%)	3 ± 0.95	8 ± 2	5 ± 2	4 ± 1.5
CD34+ (%)	10 ± 2	10 ± 4	16 ± 4	16 ± 4
NG2+ (%)	4 ± 1	3 ± 2	5 ± 1	3 ± 0.4
HSP47+ (%)	3 ± 1	3 ± 1	6 ± 1.5	2 ± 0.7
OB-CDH+ (%)	3 ± 0.2	3 ± 1	6 ± 0.5	2 ± 0.8
OMD+ (%)	1.2 ± 0.2	0.8 ± 0.3	13 ± 3	16 ± 7

### Cells isolated from control and fibrocalcified valves by collagenase digestion present all VICs subpopulations

Collagenase digestion completely eliminated endothelial cells as assessed by flow cytometry. In parallel, monocytes, macrophages and PMN represented less than 4% of the post-digestion control and fibrocalcific cell populations. All VICs subpopulations determined by histology are present after collagenase digestion as shown in **Table 2**. Vimentin was expressed by 84 ± 0.9 % of control VICs and 50 ± 6% of fibrocalcific VICs (p=0.02). Moreover, 10 ± 0.9% of control and 22 ± 4% of fibrocalcific VICs were αSMA+ (p=0.048). Determined by the αSMA+/vimentin+ ratio, VICs activation is therefore 11 ± 3% of control VICs against 44 ± 2% of fibrocalcific VICs (p=0.0002). CD90 was expressed by 8 ± 1% of control and 19 ± 6 % of fibrocalcific cells (p=0.09). About pVICs, 8 ± 2% of control and 4 ± 1.5% of fibrocalcific VICs were SSEA4+ (p=0.1) while CD34 is more expressed by fibrocalcific VICs (16 ± 4%) than control ones (10 ± 4%, p=0.3). Control and fibrocalcific cells present the similar proportion of NG2+ cells (respectively, 3 ± 2% and 3 ± 0.4%, p=0.8). For osteoblast precursors, about 3 ± 1% of control VICs were HSP47+ and OB-CDH+ while 2 ± 0.7% of fibrocalcific VICs were HSP47+ against 2 ± 0.8% for OB-CDH (p=0.5 for HSP47 and OB-CDH, control vs fibrocalcific). For obVICs, 0.8 ± 0.3% of control and 16 ± 7% of fibrocalcific VICs were OMD+ (p=0.04).

### **Behavior of the VICs subpopulations in vitro and impact on their proliferation**

Interestingly, the inflammatory cells present after collagenase digestion, disappeared in culture (data not shown). Moreover, whichever the pathophysiological state of the valve and culture support, VICs viability was 97% as assessed by flow cytometry.

### **In vitro culture induces VICs activation**

VICs activation, determined by  $\alpha$ SMA+/vimentin+ ratio, significantly increased during culture in both supports. Indeed, at P3, the control VICs activation reached 85% on plastic ( $p < 0.001$ ) and 92% on collagen ( $p < 0.001$ ). Between P3 and P5, these proportions decreased to, respectively, 60% and 82% (representing a 0.7 and 0.9 fold change). Fibrocalcific VICs activation at P3 reached 95% on plastic ( $p = 0.0006$ ) and 88% on collagen ( $p = 0.001$ ). Between P3 and P5, the proportion on plastic was stable while it increased to reach 95% on collagen (**Fig 3A**).

### **CD90 is a potential marker of qVICs and aVICs**

Regardless of the support, the expression of CD90 was similar to  $\alpha$ SMA. Indeed, it was expressed to more than 85% for control and fibrocalcific VICs whichever the support and passage (**Fig 3B**).

### **In vitro culture influences resident pVICs and do not conserve hematopoietic pVICs**

At P3, SSEA4+ VICs reached more than 90% for control or fibrocalcific cells on plastic and only 60% on collagen (between supports, control VICs:  $p = 0.0005$  and fibrocalcific VICs,  $p = 0.003$ ). On plastic, at P4, these proportions decreased (0.6 and 0.8 fold change, respectively) and furthermore at P5 (0.8 fold change) to reach, respectively, 44% and 58% (between P3 and P5: control VICs,  $p < 0.0001$  and fibrocalcific VICs,  $p = 0.004$ ). On collagen, at P4, SSEA4+ control VICs were stable but decreased at P5 to 44% like on plastic ( $p = 0.01$ ). In contrast, SSEA4+ fibrocalcific VICs were stable at each passage (**Fig 3C**).

### **CD34 expression was undetectable in vitro, regardless of the culture conditions and VICs origin.**

In vitro culture on plastic promotes subendothelial progenitor cell subpopulation.

At P3, NG2+ VICs reached 80% and 70% for control and fibrocalcific cells on plastic against only 1.5% for both VICs origin on collagen ( $p < 0.0001$  between supports). On plastic, the NG2+ control VICs decreased at P4 to reach 49% and stabilized at P5 ( $p=0.008$ ). NG2+ fibrocalcific VICs decreased by 10% at each passage to reach 50% at P5. On collagen, NG2+ VICs remained less than 1.5% for both cell origins at each passage (**Fig 3D**).

### **In vitro culture induces osteoblastic differentiation of VICs**

On plastic, at P3, less than 4% of control VICs were HSP47+ and this proportion decreased slightly at each passage (**Fig 3E**). Moreover, proportion of OB-CDH+ control VICs was less than 2% and was stable through passages (**Fig 3F**).

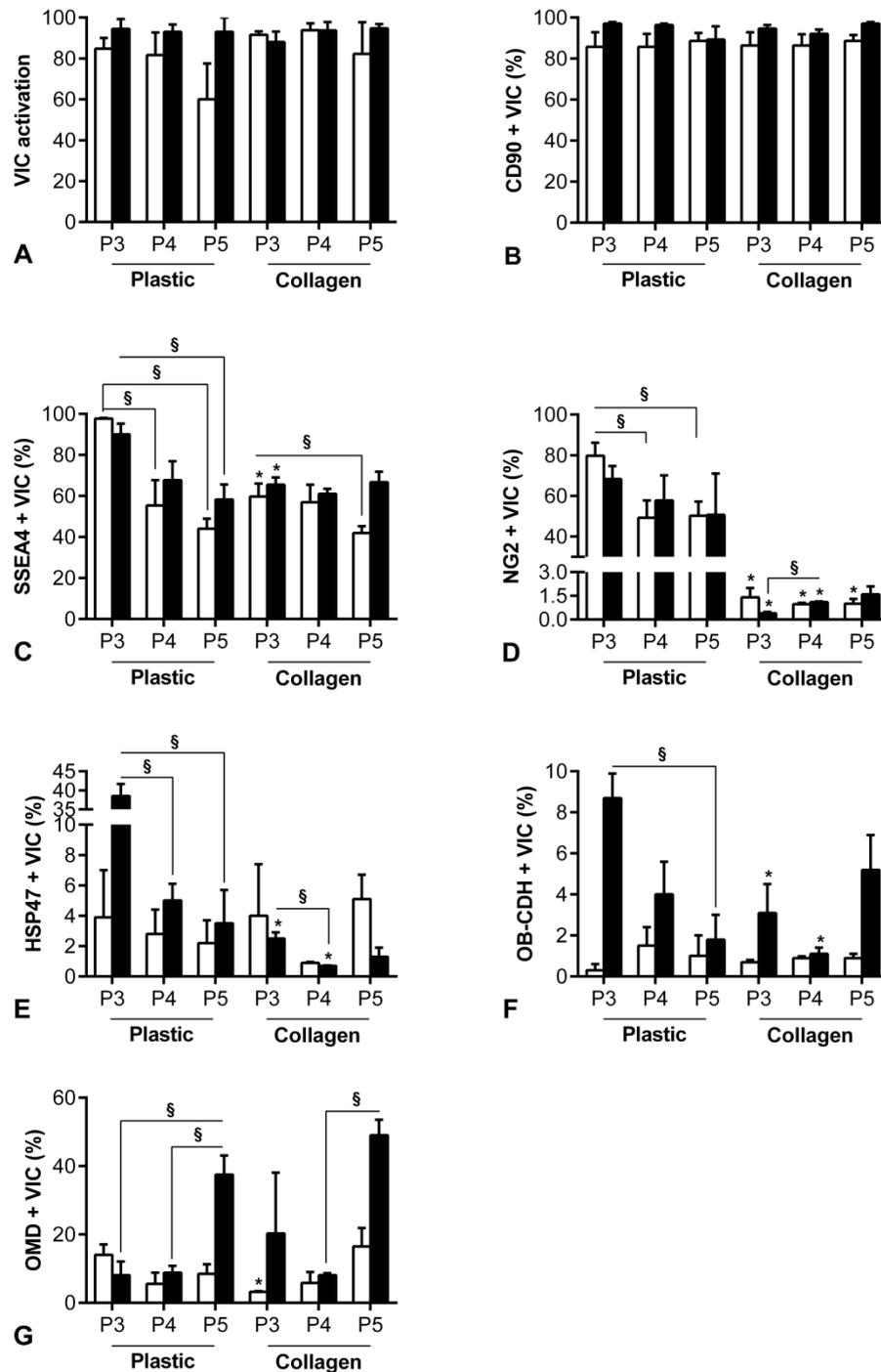
On collagen, at P3, HSP47+ control VICs were similar to plastic (4%), decreased to 1% at P4, and showed a five-fold increase at P5 (Fig 3E). Moreover, less than 2% of control VICs were OB-CDH+ and this proportion was stable through passages (**Fig 3F**).

On plastic at P3, HSP47+ fibrocalcific VICs reached to 39%. This proportion decreased drastically to 5% at P4 and stabilizing at P5 ( $p < 0.0001$ ; Fig 3E). Moreover at P3, 9% of VICs were OBCDH+ but this proportion decreased by half at each passage to reach 2% at P5 ( $p=0.002$  between P3 and P5) (**Fig 3F**).

On collagen, at P3, HSP47+ fibrocalcific VICs were significantly lower than on plastic (only 2.5%,  $p < 0.0001$ ) and this proportion stayed less than 1% at P4 and P5 (Fig 3E). Moreover, 3% of fibrocalcific VICs are OB-CDH+ at P3 and this proportion decreased to 1% at P4 before a five-fold increase at P5 (**Fig 3F**).

Highlighted by OMD, obVICs represented 14% of control VICs at P3 on plastic. After decreasing to 6% at P4, this proportion stabilized at P5. On collagen, at P3, OMD+ control VICs were significantly lower than on plastic (3%). This proportion increased at each passage to reach 16% at P5.

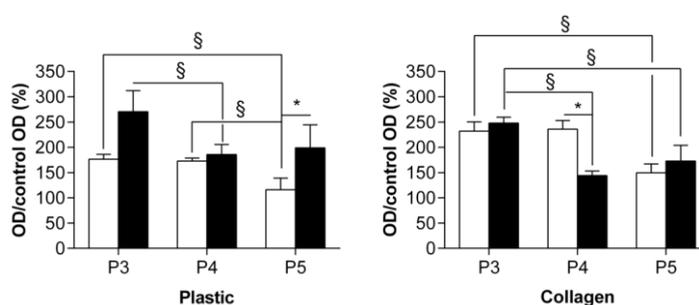
On plastic at P3, OMD+ fibrocalcific VICs were 8%. Stable at P4, this proportion increased to 38% at P5 (between P3-P4 and P3-P5:  $p=0.001$ ). On collagen, 20% of fibrocalcific VICs were OMD+ at P3 and, after a decrease at P4 (8%), this proportion increased to 49% at P5 (between P4-P5:  $p=0.001$ ; Fig 3G).



**Figure 3: Evolution of the expression of different VICs markers by control (N=3-6) and fibrocalcific (N=3-6) VICs in cultures performed on plastic or collagen support between third passage (P3) and fifth passages (P5).** (A): VICs activation proportion, (B), CD90 expression, (C): SSEA4 expression, (D): NG2 expression, (E): HSP47 expression, (F): OB-CDH expression and (G): OMD expression. Legend: \*:  $p < 0.05$  between the 2 supports. §:  $p < 0.05$  between the different passages.

## Impact of culture condition on VICs proliferation

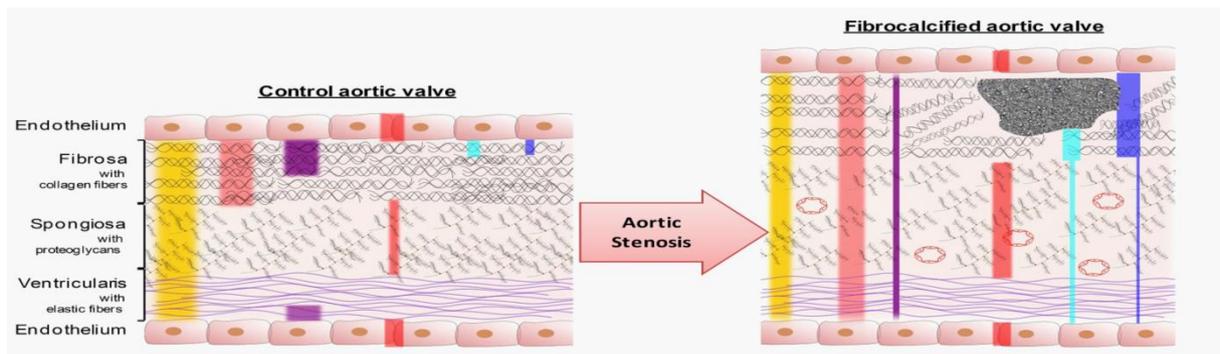
On plastic, control VICs had a similar proliferation rate at P3 and P4 (respectively, 76% and 73%), but this rate decreased drastically to 16% at P5 (between P3-P5 and P4-P5,  $p=0.01$ ; Fig 4). The proliferation rate of fibrocalcific VICs was of 170% at P3 but significantly decreased to 86% at P4 ( $p=0.03$ ), stabilizing at P5. On collagen, control VICs proliferated significantly more than on plastic at P3 and P4 (respectively, 132% and 135%;  $p < 0.01$ ). Although stable at these passages, the proliferation rate decreased significantly at P5 to only 50% ( $p=0.004$ ). The proliferation rate of fibrocalcific VICs on collagen presented the same evolution than obtained on plastic, varying from 148% at P3 to 44% at P4 and P5 ( $p=0.02$ ).



**Figure 4: Control (N=3-6, white) and fibrocalcific (N=3-6, black) VICs proliferation in cultures performed on plastic or collagen support between third passage (P3) and fifth passages (P5).** Legend: Ao: aortic side – V: ventricular side – #: calcification – arrow: important spot. §:  $p < 0.05$  between the different passages. \*:  $p < 0.05$  between 2 different pathophysiological states of the valves.

## DISCUSSION

Herein we show that all different VICs subpopulations are present in both control and fibrocalcified valves with variation of distribution and proportion (Fig 5). At first sight, the presence of aVICs, osteoblast precursors and obVICs in control valves is surprising. Nevertheless, although not stenotic or sclerotic, our control valves are not exempted of pathophysiological processes. Previous reports indicated about 30% of aVICs in sclerotic valves [7,23], corroborating the non-sclerotic stage of our control samples that had 11% of aVICs on ex vivo and post-digestion analyses. Moreover, the thinner and less cellularized aspect corroborates the control state of our highly selected samples, obtained from organ donors free from any heart disease.



**Figure 5: Illustration of distributions and proportions of each VICs subpopulations in control and fibrocalcified aortic valve.** Legend: qVICs (vimentin+) in yellow, aVICs ( $\alpha$ SMA+/CD90+) in pink, resident pVICs (SSEA4+) in purple, hematopoietic pVICs (CD34+) in red, osteoblast precursors (HSP47+/OB-CDH+) in light blue and obVICs (OMD+) in dark blue.

After collagenase digestion, all VICs subpopulations are preserved with different proportions between control and fibrocalcific VICs. VICs from fibrocalcified valves have larger populations of hematopoietic pVICs, mature obVICs and significantly more aVICs but smaller proportions of resident pVICs and osteoblast precursors than cells from control valves. The different proportions observed might not be caused by the collagenase digestion because the incubation lasts only 45 minutes. Concerning the variability observed between ex vivo and post-digestion analyses of SSEA4, this could be explained by the fact that the SSEA4+ VICs were disseminated in fibrocalcified valves while these cells constituted compact niches near the endothelium of controls ones. It is likely that the analysis of the relative area of SSEA4 positive staining slightly overestimates the population of SSEA4+ VICs within the fibrocalcified valve while it is underestimated in the control one.

In this study, we chose to work with usual in vitro culture conditions: on plastic flasks and collagen coating, supposed to better reproduce physiological conditions [26,27]. Indeed, the collagen is an essential element of valvular ECM and frequently used in in vitro culture of fibroblastic-like cells [28]. In the literature, vimentin is the usual VICs marker to assess culture quality [6,7]. Our results confirm that, whichever the pathophysiological origin of cells and culture support, all VICs express vimentin. Nevertheless, it does not allow discrimination of VICs subpopulations. Another frequently used marker is  $\alpha$ SMA, which is associated with VICs activation and further tissue repair or fibrocalcification [6,7,11]. It is interesting to evaluate the phenomenon of VICs activation which is the main limitation of

VICs culture [22,23], by the  $\alpha$ SMA<sup>+</sup>/vimentin<sup>+</sup> ratio. However, our results of ex vivo and post-digestion analyses show that aVICs are already more present in fibrocalcific VICs than control ones and amplified in culture. Such activation is described in literature [14,20], although our observation of such a behavior on collagen contradicts previous studies [22,23]. Interestingly, we observe similar expressions of CD90 and  $\alpha$ SMA, suggesting that CD90 may also identify aVICs. Indeed, this polyvalent marker is able to identify various cell types: (myo)fibroblasts, activated endothelial cells and different stem cells [17-19]. Therefore, the identification of CD90 expression by VICs is of great interest for its potential as a subpopulation marker. Moreover, contrary to  $\alpha$ SMA, CD90 is a membrane protein. It is, thus, easier to highlight of aVICs by CD90 than  $\alpha$ SMA which is located in the cytosol.

Whichever the culture support, hematopoietic pVICs (CD34<sup>+</sup>) present in aortic valves and after digestion, disappeared completely during culture. Their absence may be explained by their elimination by the medium or differentiation. In the latter case, such cells could have differentiated into subendothelial progenitor cells (NG2<sup>+</sup>) on plastic support or osteoblast precursors (HSP47<sup>+</sup>/OB-CDH<sup>+</sup>) on both supports, since both subpopulations were more abundant in VICs culture than in post-digestion. This suggests the implication of these cells in neo-angiogenesis and/or calcification processes according to the pathophysiological state of VICs and the cell environment [6,10,16]. About the very low rate of NG2 cells on collagen, it should be noted that this rate is similar to that observed in ex vivo and on post-digestion. It was previously reported that the degradation of the ECM is needed to initiate the process of EMT and neoangiogenesis [29] in which the NG2<sup>+</sup> cells are involved. Thus, the presence of collagen in culture could inhibit therefore cell differentiation into NG2<sup>+</sup>.

Resident pVICs (SSEA4<sup>+</sup>) are observed from valve digestion through P5, but this expression was much more stable on collagen than on plastic, confirming that valvular ECM stabilizes this population. Indeed, through cell interaction and regulation of the presentation of transforming factors, the ECM is a dynamic modulator of stem cell niches [30]. Moreover, whereas the resident pVICs proportion decreases on plastic, aVICs population ( $\alpha$ SMA<sup>+</sup>) increases on same support indicating a potential cell differentiation and/or activation. This result confirms the implication of resident pVICs in cell renewal [6]. In vitro, spontaneous osteoblastic differentiation was reported in 2 studies: (1) in 1999, Mohler et al. identified and quantified the spontaneous formation of calcified nodule on canine and fibrocalcific VICs culture performed on plastic from explant technique [24]. (2) In 2008,

Benton et al. demonstrated the presence of this spontaneous osteoblastic differentiation in porcine VICs cultured on different supports as elastin and fibronectin by Alizarin Red S coloration and measure of alkaline phosphatase activity [25]. In our study, we discriminated osteoblast precursors and obVICs. We show the similar expression of HSP47 and OB-CDH suggesting that both proteins may identify osteoblast precursors, which may differentiate into OMD-expressing obVICs. As expected, VICs from fibrocalcified valves presented higher proportions of obVICs after collagenase digestion. In vitro culture could also induce spontaneous osteoblastic differentiation and decreasing the proportion of osteoblast precursors. These results highlight the importance of cell origin and culture supports in the evaluation of cellular responses in vitro.

Our findings also underscore the role of culture support on cell proliferation. Interestingly, control VICs proliferated more on collagen while fibrocalcific VICs proliferated more on plastic. Although the proliferation rate tended to decrease throughout passages, as already described for mesenchymal cells [31]. Once again, it emphasizes the importance of cell origin and the design of appropriate experimental groups.

This study of in vitro culture has some limitations. First, it is the elimination of calcified tissue before collagenase digestion that very likely leads to a cellular sorting as tissue adjacent to calcifications is eliminated. Nevertheless, our previous analyses showed that cells present in these areas are not viable after collagenase digestion. Moreover, it is difficult to analyze the VICs population from P1 to P5 because P1 and P2 present a too small number of cells. Indeed, P1 or P2 analysis would consume all VICs population making impossible the consecutive analysis of passages frequently used in the literature (P3 to P5). The absence of hemodynamic environment on our VICs culture is a limit while it is known that hemodynamic forces on the aortic valve contribute to valvular homeostasis especially by regulating the activation of VICs and osteoblastic differentiation. As demonstrated by Konduri et al., porcine aortic valves placed on ex vivo pulsatile organ culture system, conserved its ECM composition, cell viability, proliferation and  $\alpha$ SMA content while porcine aortic valves placed on static condition presented a content of elastin, glycosaminoglycans and  $\alpha$ SMA decreased with significant cell death [32]. Moreover, it is known that the fibrosa side calcify further than ventricular side because shear stress on the fibrosa side is more important than on ventricular side [33]. However, we did not observe the decrease in the expression of  $\alpha$ SMA or the presence of cell death in our study. All VICs

subpopulations, except for hematopoietic pVICs, are present in culture, whichever the support. Nevertheless, our results allow considering many tracks to improve the culture of VICs in order to extrapolate mechanisms studied in vitro to the real development of AS and identify new pharmacological targets. Thus, culture on collagen seems to be a wise choice since it stabilizes resident pVICs and subendothelial progenitors. However, collagen does not prevent the elimination of hematopoietic pVICs, neither VICs activation and osteoblast differentiation. Finally, with low proliferation at P5 even on collagen, we suggest that future studies should not be performed on more advanced passages. In addition further investigation is needed to evaluate the influence of other culture supports, such as the poly (ethylene glycol) gel (PEG gel), recently shown to prevent VICs activation in vitro [34], on the different VICs subpopulations.

Potentially, using the markers described herein, one could apply FACS cell sorting to isolate VICs subpopulations and study them individually. Therefore, the effects of potential drug candidates could be assessed on each phenotype and provide a broader understanding of their benefits and limitations. Moreover, the implication of different VICs subpopulations in the success or failure of valve bioprostheses may also be assessed through cell sorting and culture.

## **CONCLUSION**

In conclusion, our study has established a list of usable antibodies for detailed phenotyping of human VICs. VICs subpopulations, isolated by collagenase digestion, are found in both control and fibrocalcified valves with different proportions. Moreover, VICs culture is representative of the heterogeneity observed in the valves. Primary VICs culture therefore provides a good model to study their implication in AS and the correct experimental design and consideration of cell origin are essential to study these heterogeneous cell type and generate interpretable data.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Alexandre Ung and Pr. Claude Alain Maurage from the institute of pathology of Centre de Biologie Pathologie Pierre-Marie Degand (CHU Lille) for their excellent technical support and to Frederic Mouquet for his attentive reviewing.

## REFERENCES

1. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, et al. (1997) Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 29: 630-634.
2. Olsson M, Thyberg J, Nilsson J (1999) Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1218-1222.
3. Soini Y, Salo T, Satta J (2003) Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis. *Hum Pathol* 34: 756-763.
4. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kilic R, et al. (2003) Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* 170: 205-211.
5. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, et al. (2003) Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 107: 2181-2184.
6. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI (2007) The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol* 171: 1407-1418.
7. Rabkin-Aikawa E, Farber M, Aikawa M, Schoen FJ (2004) Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J Heart Valve Dis* 13: 841-847.
8. Armstrong EJ, Bischoff J (2004) Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res* 95: 459-470.
9. Chalajour F, Treede H, Ebrahimnejad A, Lauke H, Reichensperner H, et al. (2004) Angiogenic activation of valvular endothelial cells in aortic valve stenosis. *Exp Cell Res* 298: 455-464.
10. Gossel M, Khosla S, Zhang X, Higano N, Jordan KL, et al. (2012) Role of circulating osteogenic progenitor cells in calcific aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 60: 1945-1953.
11. Durbin AD, Gotlieb AI (2002) Advances towards understanding heart valve response to injury. *Cardiovasc Pathol* 11: 69-77.
12. Rajamannan NM (2012) Oxidative-mechanical stress signals stem cell niche mediated Lrp5 osteogenesis in eNOS(-/-) null mice. *J Cell Biochem* 113: 1623-1634.
13. Wang H, Sridhar B, Leinwand LA, Anseth KS (2013) Characterization of cell subpopulations expressing progenitor cell markers in porcine cardiac valves. *PLoS One* 8: e69667.
14. Chen H, Cui W, Hu H, Liu J (2014) Isolation and culture of rat aortic valve interstitial cells. *Anatol J Cardiol*.
15. Butcher JT, Nerem RM (2004) Porcine aortic valve interstitial cells in three-dimensional culture: comparison of phenotype with aortic smooth muscle cells. *J Heart Valve Dis* 13: 478-485; discussion 485-476.
16. Chen JH, Yip CY, Sone ED, Simmons CA (2009) Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential. *Am J Pathol* 174: 1109-1119.
17. Bradley JE, Ramirez G, Hagood JS (2009) Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent

- modulator of cell phenotype. *Biofactors* 35: 258-265.
18. Koumas L, Smith TJ, Feldon S, Blumberg N, Phipps RP (2003) Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes. *Am J Pathol* 163: 1291-1300.
  19. Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF (2013) Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histol Histopathol* 28: 1109-1116.
  20. Stephens EH, Grande-Allen KJ (2007) Age-related changes in collagen synthesis and turnover in porcine heart valves. *J Heart Valve Dis* 16: 672-682.
  21. Twine NA, Chen L, Pang CN, Wilkins MR, Kassem M (2014) Identification of differentiation-stage specific markers that define the ex vivo osteoblastic phenotype. *Bone* 67: 23-32.
  22. Pho M, Lee W, Watt DR, Laschinger C, Simmons CA, et al. (2008) Cofilin is a marker of myofibroblast differentiation in cells from porcine aortic cardiac valves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1767-1778.
  23. Taylor PM, Allen SP, Yacoub MH (2000) Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin. *J Heart Valve Dis* 9: 150-158.
  24. Mohler ER, 3rd, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, et al. (1999) Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *J Heart Valve Dis* 8: 254-260.
  25. Benton JA, Kern HB, Anseth KS (2008) Substrate properties influence calcification in valvular interstitial cell culture. *J Heart Valve Dis* 17: 689-699.
  26. Quinlan AM, Billiar KL (2012) Investigating the role of substrate stiffness in the persistence of valvular interstitial cell activation. *J Biomed Mater Res A* 100: 2474-2482.
  27. Rodriguez KJ, Masters KS (2009) Regulation of valvular interstitial cell calcification by components of the extracellular matrix. *J Biomed Mater Res A* 90: 1043-1053.
  28. Latif N, Sarathchandra P, Taylor PM, Antoniow J, Yacoub MH (2005) Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves. *J Heart Valve Dis* 14: 218-227.
  29. Li C, Xu S, Gotlieb AI (2013) The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops. *Cardiovasc Pathol* 22: 1-8.
  30. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P (2014) Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta* 1840: 2506-2519.
  31. Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, et al. (2013) Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci* 14: 17986-18001.
  32. Konduri S, Xing Y, Warnock JN, He Z, Yoganathan AP (2005) Normal physiological conditions maintain the biological characteristics of porcine aortic heart valves: an ex vivo organ culture study. *Annals of biomedical engineering* 33: 1158-1166.
  33. Arjunon S, Rathan S, Jo H, Yoganathan AP (2013) Aortic valve: mechanical environment and mechanobiology. *Annals of biomedical engineering* 41: 1331-1346.
  34. Mabry KM, Payne SZ, Anseth KS (2015) Microarray analyses to quantify advantages of 2D and 3D hydrogel culture systems in maintaining the native valvular interstitial cell phenotype. *Biomaterials* 74: 31-41.

## **II. Tissue Factor mediates the commitment of human valve interstitial cells to profibrotic and procalcific processes.**

Ahmed Elkalioubie<sup>1</sup>, Anaïs Arbesu Y Miar<sup>1</sup>, Rodrigo Lorenzi<sup>1</sup>, Francis Juthier<sup>1,2</sup>,  
André Vincentelli<sup>1,2</sup>, Ramadan Jashari<sup>3</sup>, Annabelle Dupont<sup>1</sup>, Delphine Corseaux<sup>1</sup>,  
Bart Staels<sup>1</sup>, Eric van Belle<sup>1</sup>, Sophie Susen<sup>1\*</sup>

- <sup>1</sup>. Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011, EGID, F-59000 Lille, France
- <sup>2</sup>. Department of Cardiovascular Surgery, Centre Hospitalier Regional et Universitaire de Lille, Lille, France.
- <sup>3</sup>. European Homograft Bank, Brussels, Belgium.

**Running title:** Tissue factor mediates fibrosis and calcifications in aortic valve

### **\*Corresponding author:**

Sophie Susen, Inserm UMR 1011, Medicine Faculty – Research Pole – J&K; Boulevard du Professeur Jules Leclercq; 59045 Lille Cedex – France. Telephone and fax number: +33 320.62.35.70. E-mail: Sophie.SUSEN@CHRU-LILLE.FR.

**Keywords:** tissue factor, aortic stenosis and fibrosis.

## **ABSTRACT**

**Objectives:** Valve interstitial cells (VICs), prevalent cell type of aortic valves, play a key role in the aortic stenosis (AS) development. Tissue factor (TF), main coagulation initiator, contributes to atherogenic processes. Therefore, we aimed to investigate the potential role of TF in profibrotic and procalcific processes of AS.

**Methods and Results:** 71 patients of aortic valve transplantation due to AS and 27 control patients were enrolled. TF expression was analyzed in isolated VICs with or without inflammatory induction. More expressed by fibrocalcific VICs, IL1 $\beta$  induced a similar TF expression in control VIC. FVIIa treatment induced the overexpression of fibronectin, RUNX2 and  $\beta$ -catenin in a TF-dependent manner.

**Conclusions:** TF expression is increased in AS and its association with FVIIa may be one of the mechanisms through which VIC are committed to the profibrotic and procalcific processes underlying AS development and progression.

## INTRODUCTION

Aortic stenosis (AS) is the third cardiopathology in the western world [1]. Described as an atherosclerosis-like pathology, its development involves the valvular interstitial cells (VICs). Prevalent cell type of aortic valve, VICs are able to differentiate into osteoblast-like cells under mechanical and inflammatory stresses and supposed to be a key mediators of the progression of AS [2-4]. Indeed, VICs acquire a pro-calcific phenotype under mechanical and inflammatory stresses [5, 6]. Osteoblastic differentiation of VIC involves the activation of  $\beta$ -catenin and the increased expression of runt-related transcription factor 2 (RUNX2) [5, 7]. Tissue factor (TF) is the main initiator of blood coagulation but is also implicated in fibrosis process in idiopathic pulmonary fibrosis and found in valves from AS patients in calcified zone [8-10]. We aimed to investigate whether TF activation could play a role in the processes of AS.

## METHODS

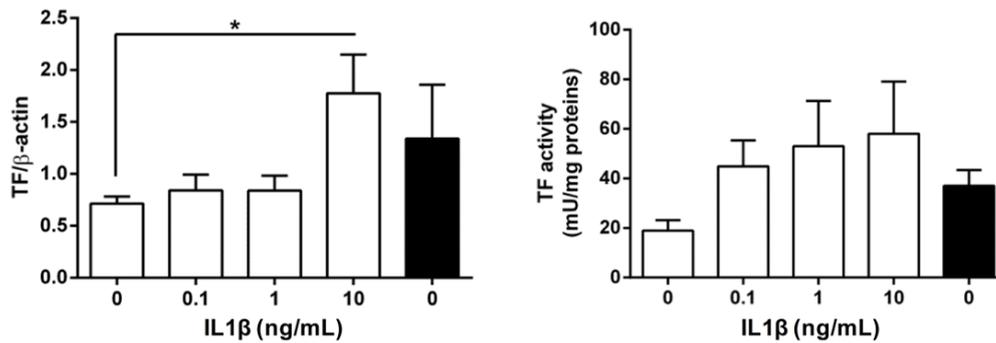
Twenty-seven control valves were collected from organ donors excluded of a transplantation protocol and free-cardiac disease (European Homograft Bank, Brussels, Belgium). Valves were thin, translucent, flexible and non-calcified. Seventy-one fibrocalcified valves were obtained from patients undergoing surgical aortic valve replacement for moderate to severe AS at our institution (CHU Lille, France). Rheumatic and bicuspid aortic valves were excluded. Diagnosis was made by echography according to guidelines of the European Society of Cardiology. These valves were calcified, thickened, vascularized and presented lipid deposits. The investigations were conducted according to the Declaration of Helsinki principles and were approved by the local institutional review board and ethics committee of the CHRU Lille, France (CPP n° 2008\_13/0839). Informed consent was obtained from either the patients or their next-of-kin. VICs were isolated from valves by collagenase digestion (type I, 0.3%, 1h at 37°C, Life technology). Cultures were performed in supplemented SMC Growth Medium 2 (5% FCS, Promocell) on culture flasks (25 cm<sup>2</sup> – 75 cm<sup>2</sup>; BD Biosciences). Passages 3 (P3) to 5 (P5) were used for the experiments described herein. After 24h of incubation in starvation medium (0.1% FCS), control VIC were exposed to IL1 $\beta$  (concentrations: 0.1; 1; 10 and 20 ng/mL) for 8h (protein and activity).

To investigate fibronectin and RUNX2 expressions, control VICs were stimulated with 10 ng/mL IL1 $\beta$  for 8h for TF overexpression and then stimulated in the presence of 50 nM FVIIa (48h for fibronectin and RUNX2 and 15, 30 and 45 minutes for  $\beta$ -catenin) with or without pre-incubation with anti TF antibody 4501 (20  $\mu$ g/mL, Sekisui Diagnostics). TF activity was assessed in quiescent (constitutive TF expression) and activated (IL1 $\beta$ -induced TF expression) VICs and measured with a two-step chromogenic assay as previously reported [11]. TF activity was reported as mU/mg proteins. To analyze the protein expression, cells were lysed in ice-cold RIPA buffer, supplemented with phosphatases and proteases inhibitors (Roche). 10 $\mu$ g of protein of the lysates were separated on a 4-12% polyacrylamide gel under reducing conditions, followed by electro-transfer to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked then incubated overnight with primary specific antibody (TF 4509 at 1/200, phospho  $\beta$ -catenin (1/250, Cell Signaling Technologies),  $\beta$ -catenin (1/500, Cell Signaling Technologies); RUNX2 (1/250, Interchim) and Fibronectin (1/1000, Abcam). Afterwards, the membranes were incubated with peroxidase-labelled secondary antibodies (1/1000) (BioRad, Hercules, CA) and final detection performed using the Novex ECL Kit (Life Technologies). Beta-actin (Cell Signaling Technologies) or  $\alpha$ -tubulin (Abcam) were used as loading control (1/5000 antibody dilution). Data were presented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired t-tests were used to evaluate statistical differences and p value of  $< 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

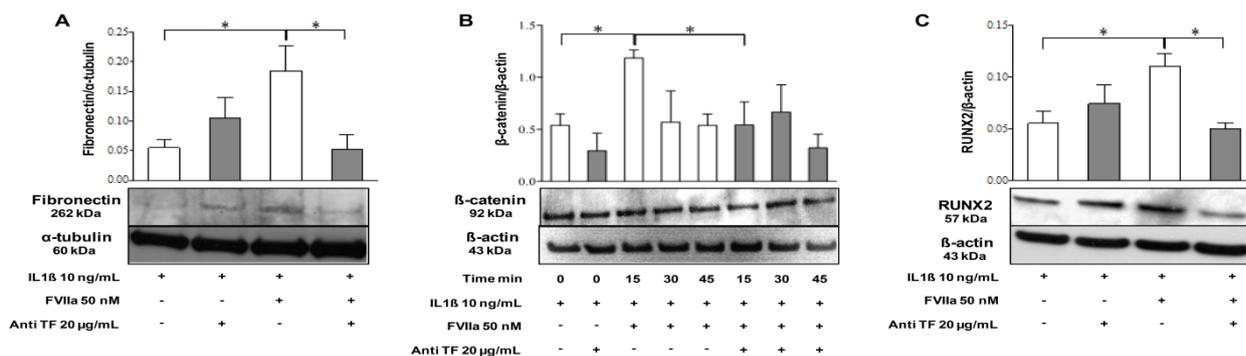
We included 71 patients with moderate to severe fibrocalcified aortic valve disease scheduled for surgical aortic valve replacement as well as 27 control individuals. When compared to control valve donors, AS patients were older (74 vs 48,  $p < 0.0001$ ), with a higher BMI (29 vs 24,  $p = 0.04$ ) and higher incidence of coronary artery disease. VICs isolated from fibrocalcified valves presented higher levels of TF antigen not statistically different between fibrocalcific and control VICs but TF pro-coagulant activity was increased in VICs from fibrocalcified valves in comparison to control (1.9 fold,  $p = 0.03$ , **Figure 1**). FXa generation by VICs lysates was completely prevented by a goat anti-human TF antibody, demonstrating the TF-dependence of the assay (results not shown). TF expression was induced in control VICs with increasing concentrations of IL1 $\beta$ . Up to 10ng/ml, IL-1 $\beta$  induced a dose-dependent increase in TF antigen expression and activity (**Figure 1**). Henceforth, all experiments were performed in VICs stimulated by 10ng/ml IL-1 $\beta$  to

overexpress TF.



**Figure 1: TF expression and activity of control VICs (white) and fibrocalcific VICs (black).**  
Legend: \*: p<0.05

The commitment of VICs to a profibrotic phenotype was assessed by fibronectin expression. FVIIa stimulation for 48 hours led to a TF-dependent significant expression of fibronectin (**Figure 2A**), with a 72% inhibition in the presence on anti-TF antibody (p<0.05). The implication of TF in procalcific processes was assessed by β-catenin and RUNX2 expression. Expression of total β-catenin was increased (**Figure 2B**) in TF-overexpressing VICs following FVIIa stimulation, with a maximum effect at 15 min. An inhibition of 55% in β-catenin expression was achieved in the presence of anti-TF (p < 0.05). Moreover, FVIIa stimulation for 48 hours induced the expression of the osteoblast-associated transcription factor RUNX2 (**Figure 2C**) which was also inhibited by anti-TF antibody (55%, p<0.05).



**Figure 2: Modulation of fibrosis and calcification markers by TF-FVIIa.**

**(A): Significant synthesis of fibronectin in control VICs after 48 hours of stimulation in a TF-dependant manner. (B): Significant synthesis of β-catenin in control VICs after 15 minutes of stimulation in a TF-dependant manner. (C): Significant synthesis of RUNX2 in control VICs after 48 hours of stimulation in a TF-dependant manner.** TF expression was induced in VICs by IL1β stimulation for 8h. The inhibition was performed with TF antibody 4501. Representative immunoblots of 4 experiments.

## DISCUSSION

Tissue factor is the major initiator of coagulation, associating with FVIIa to generate FXa and thrombin. Nonetheless, accumulating evidence show that TF has roles in cardiovascular diseases other than through its prothrombotic action. Particularly in atherosclerosis, TF expression is increased in monocytes of early plaques [12]. Throughout plaque development, TF expression is observed in endothelial cells, foam cells and smooth muscle cells [12, 13]. In the latter, association between FVIIa and TF induces migration and cell proliferation [14, 15]. Herein, we showed that TF is overexpressed by VICs isolated from fibrocalcified valves in comparison with control ones. This result is in accordance with our previous observation of tissue factor overexpression in a rabbit model of valve sclerosis and the concept of AS as an atherosclerosis-like disease [16]. First, this confirms that the VICs express the TF as histological analyzes had previously assumed [17]. Moreover, similar to atherosclerosis, TF overexpression in aortic valve is probably associated with the increased mechanical stress and inflammation that are known to induce TF expression [18, 19]. In particular, IL-1 $\beta$  was shown to induce TF expression in macrophages and endothelial cells [20, 21]. Moreover, mice that do not express the IL-1 receptor antagonist spontaneously develop aortic valve stenosis [22]. Wygrecka and colleagues presented evidence of TF implication in pulmonary fibrosis [23]. In their study, TF activation by FVIIa induces proliferation of lung fibroblasts and the expression of fibronectin, directly contributing to fibrosis. Our findings corroborate this hypothesis of TF-mediated fibrosis, but in AS development context. Indeed, fibronectin production is a classic component of profibrotic processes and was prevented by anti-TF antibody.

This study has some limitations. First, due to the origin of control valves, some clinico-biological data of patients could not be retrieved, hampering a better description of the whole study population. Second, in this study, VICs were cultured directly on plastic flasks, which may not represent accurately the physiological environment of these cells *in vivo*. Third, our findings on TF activation are *in vitro* only, which limit their relevance to the human disease. Nonetheless, animal models of aortic valve disease are scarce and often inefficient [24]. Future studies should address these issues to provide a better understanding of the present findings.

## CONCLUSION

In conclusion, we have shown that TF expression is inducible in aortic valves and its association with FVIIa may be a key mechanism driving aortic valve disease progression. Since the late stages of AS impose surgical intervention, therapeutic targets to slow early stages progression are crucial. Specific strategies aiming at inhibiting TF expression and/or activity should be approached in future studies to elucidate the true role of TF in aortic valve stenosis and its potential as a therapeutic target.

## REFERENCES

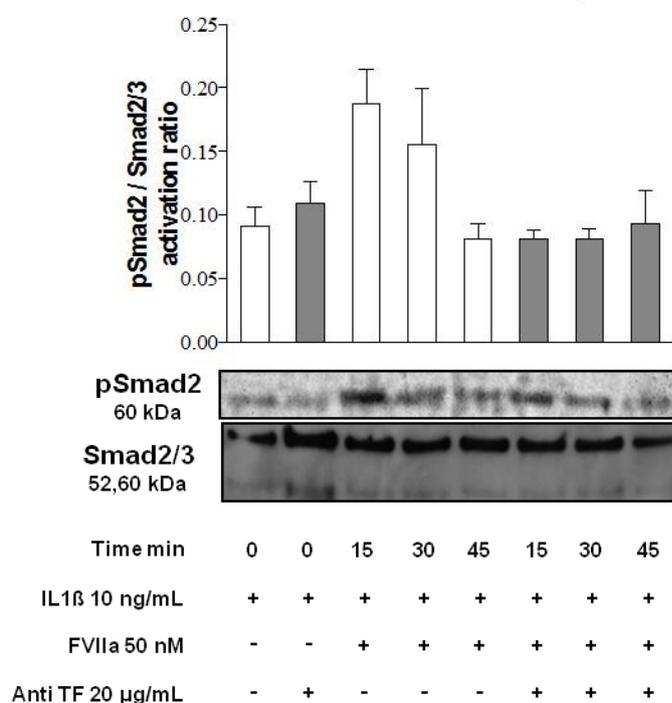
1. Pibarot, P. and J.G. Dumesnil, New concepts in valvular hemodynamics: implications for diagnosis and treatment of aortic stenosis. *The Canadian journal of cardiology*, 2007. **23 Suppl B**: p. 40B-47B.
2. Liu, A.C., V.R. Joag, and A.I. Gotlieb, The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *The American journal of pathology*, 2007. **171**(5): p. 1407-18.
3. Freeman, R.V. and C.M. Otto, Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*, 2005. **111**(24): p. 3316-26.
4. Rabkin-Aikawa, E., et al., Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *The Journal of heart valve disease*, 2004. **13**(5): p. 841-7.
5. Carrion, K., et al., The Long Non-Coding HOTAIR Is Modulated by Cyclic Stretch and WNT/beta-CATENIN in Human Aortic Valve Cells and Is a Novel Repressor of Calcification Genes. *PLoS One*, 2014. **9**(5): p. e96577.
6. Galeone, A., et al., Aortic valvular interstitial cells apoptosis and calcification are mediated by TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Int J Cardiol*, 2013. **169**(4): p. 296-304.
7. Zhang, X.W., et al., Twist-related protein 1 negatively regulated osteoblastic transdifferentiation of human aortic valve interstitial cells by directly inhibiting runt-related transcription factor 2. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014.
8. Martin, D.M., C.W. Boys, and W. Ruf, Tissue factor: molecular recognition and cofactor function. *FASEB J*, 1995. **9**(10): p. 852-9.
9. Breyne, J., et al., Atherosclerotic-like process in aortic stenosis: activation of the tissue factor-thrombin pathway and potential role through osteopontin alteration. *Atherosclerosis*, 2010. **213**(2): p. 369-76.
10. Wygrecka, M., et al., Role of protease-activated receptor-2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2011. **183**(12): p. 1703-14.
11. Jude, B., et al., Detection of monocyte tissue factor after endotoxin stimulation: comparison of one functional and three immunological methods. *Thromb Res*, 1995. **79**(1): p. 65-72.
12. Wilcox, J.N., et al., Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(8): p. 2839-43.
13. Thiruvikraman, S.V., et al., In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin-labeled factors VIIa and X. *Lab Invest*, 1996. **75**(4): p. 451-61.
14. Sato, Y., et al., Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells. *Thromb Haemost*, 1996. **75**(3): p. 389-92.

15. Cirillo, P., et al., Tissue factor binding of activated factor VII triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase activation. *Circulation*, 2004. **109**(23): p. 2911-6.
16. Marechaux, S., et al., Identification of tissue factor in experimental aortic valve sclerosis. *Cardiovasc Pathol*, 2009. **18**(2): p. 67-76.
17. Natarska, J., et al., Evidence for tissue factor expression in aortic valves in patients with aortic stenosis. *Pol Arch Med Wewn*, 2009. **119**(10): p. 636-43.
18. Abe, R., et al., Varying effects of hemodynamic forces on tissue factor RNA expression in human endothelial cells. *J Surg Res*, 2011. **170**(1): p. 150-6.
19. Lin, M.C., et al., Shear stress induction of the tissue factor gene. *J Clin Invest*, 1997. **99**(4): p. 737-44.
20. Osnes, L.T., et al., Inhibition of IL-1 induced tissue factor (TF) synthesis and procoagulant activity (PCA) in purified human monocytes by IL-4, IL-10 and IL-13. *Cytokine*, 1996. **8**(11): p. 822-7.
21. Puhlmann, M., et al., Interleukin-1beta induced vascular permeability is dependent on induction of endothelial tissue factor (TF) activity. *J Transl Med*, 2005. **3**: p. 37.
22. Isoda, K., et al., Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(4): p. 708-15.
23. Wygrecka, M., et al., Role of protease-activated receptor-2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011. **183**(12): p. 1703-14.
24. Miller, J.D., R.M. Weiss, and D.D. Heistad, Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circ Res*, 2011. **108**(11): p. 1392-412.

## RESULTATS PRELIMINAIRES

Bien que nous ayons mis en évidence l'implication du FT dans le processus de fibrose par amplification de l'expression de la fibronectine, le ou les médiateurs intracellulaire(s) impliqué(s) dans ce processus restai(en)t indéterminé(s). Ainsi, nous avons entrepris d'étudier la voie de signalisation Smad2 impliquée dans diverses pathologies fibrotiques telle que l'asthme (Royce, Cheng et al. 2012). Dans cette pathologie, la phosphorylation de Smad2 induit la différenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes qui expriment davantage d'éléments de l'ECM conduisant progressivement à la fibrose du tissu pulmonaire.

Ainsi, la voie de signalisation Smad 2 a été étudiée dans les mêmes conditions que la  $\beta$ -caténine: surexpression du FT induite par une incubation des VICs contrôles de 8 h avec de l'IL1 $\beta$ , inhibition ou non du FT par un anticorps neutralisant (incubation de 30 minutes) et exposition des cellules avec le FVII par incubation de 15, 30 ou 45 minutes. Bien que préliminaires (N=2), ces résultats tendent à confirmer que cette voie est impliquée dans le processus de fibrose induit par les VICs et modulée de manière FT-dépendante (**Figure 1**).

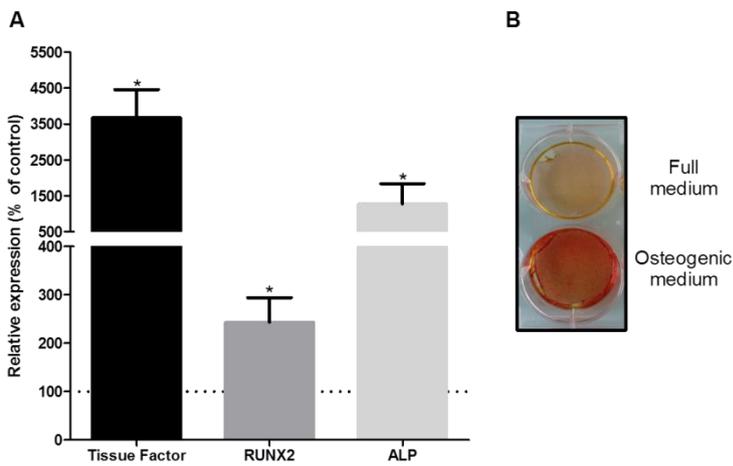


**Figure 1 : Expression FT dépendante de pSmad2 par les VICs contrôles (N=2) après 15, 30 et 45 minutes de stimulation avec le FVII. Immunoblots représentatif des 2 expériences.**

Nous avons également voulu déterminer si l'expression du FT par les VICs était inductible par d'autre élément impliqué dans le développement de la Sao tel que l'environnement procalcifiant. En effet, une telle implication renforcerait le caractère crucial du FT dans le développement de la Sao et en ferait une cible thérapeutique-clé et ce, quel que soit le stade de la pathologie car l'inhibition du FT, même tardive, permettrait de ralentir les 2 processus-clés du remodelage du tissu valvulaire: la fibrose et la calcification.

Ainsi, le milieu procalcifiant utilisé est constitué de SMC Growth Medium 2 (5% FCS, Promocell) auquel on ajoute de l'acide ascorbique (50  $\mu\text{M}$ ), du  $\beta$ -glycérophosphate (20mM), de la dexaméthosone ( $10^{-7}$  M) et de l'insuline ( $8,6 \cdot 10^{-7}$  M). Les VICs contrôlesensemencées dans des plaques 24 puits ( $10^5$  cellules/puits) ont exposées à ce milieu durant 21 jours. Les VICs exposées au milieu standard constituent le contrôle négatif de cette expérience. Les milieux ont été changés 2 fois par semaines. A la fin des 21 jours, le milieu a été retiré et les cellules lavées 3 fois avec de l'HBSS froid. La formation de calcification a été évaluée par la coloration rouge Alizarine réalisée, comme précédemment reporté (Lind, Sundqvist et al. 2013), dans un puits sacrifié pour chaque condition. Pour l'analyse ARNm du FT, de RUNX2 et de la phosphatase alcaline (ALP, marqueur de calcification), le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées avec de l'HBSS avant d'être lysées dans du TRIzol (Thermo Fischer Scientific). L'extraction a été réalisée conformément aux instructions de la firme. La RT-PCR a été effectuée en utilisant le 7900 HT fast Real-Time PCR System (Life Technologies) avec la technologie TaqMan. L'expression des transcrits a été normalisé avec l'expression du gène Abelson (Ipsogen), utilisé comme gène de référence. La quantification relative des transcrits a été réalisé en utilisant la méthode comparative du *Cycle threshold* (Ct) avec la formule  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Pour chaque échantillon, la détection des produits PCR a été effectuée séparément et en duplicat. La solution de réaction préparée contenait 2 ng d'ADNc des primers forward et reverse adéquats, des sondes (concentration finale de 240 nM) et de 12,5  $\mu\text{L}$  de Taqman *Universal PCR Master Mix* pour un volume final de 25  $\mu\text{L}$ . Le cycle du programme utilisé consistait en une dénaturation initiale de 10 minutes à 95°C, puis de 50 cycles de 15 secondes de phase de dénaturation à 95°C suivi d'une minute d'*annealing* et d'une phase d'extension à 60°C. Nous avons ensuite reporté l'expression du FT, de RUNX2 et d'ALP aux mesures effectuées dans la condition contrôle afin de déterminer l'expression relative à cette condition. On constate alors, comme le montre la **Figure 2**, que l'expression du FT est fortement induite par le milieu procalcifiant qui induit effectivement la

différenciation ostéoblastique des VICs comme le montre l'expression relative de RUNX2 et de l'ALP mais également la coloration rouge Alizarine du puits sacrifiées.



**Figure 2 : Impact de l'incubation des VICs contrôles (N=4) en milieu procalcifiant (21 jours).**

**(A): Expression relative du FT, de RUNX2 et de la phosphatase alcaline par les VICs contrôles après incubation (B) coloration rouge Alizarine des VICs contrôles après incubation. Légende: \*:  $p < 0,05$ .**

Encourageant, ces résultats préliminaires devront être néanmoins confirmés.

## DISCUSSION

### **I. Caractérisation du tissu valvulaire aortique contrôle et fibrocalcifié.**

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans le développement de la Sao, notre équipe collecte des valves aortiques humaines contrôles et fibrocalcifiées. Collectées et fournies par le Pr. Ramadan Jashari de l'*European Homograft Bank* de Bruxelles (Belgique), les valves contrôles sont exclues du protocole de transplantation en raison d'une dissection non optimale du tissu valvulaire au moment du prélèvement. Issues de personnes « accidentées de la vie » à l'âge extrêmement variable (de 14 à 64 ans) et ne présentant aucune pathologie cardiaque, il était nécessaire de caractériser ces valves puisque de tels contrôles n'avaient encore jamais été rapportés dans la littérature. Recueillies de patients souffrant de Sao sévère lors de leur remplacement valvulaire effectué au sein du service de chirurgie cardiaque du pôle Cardio Vasculaire et Pulmonaire du CHU de Lille dirigé par le Pr. Alain Prat, l'analyse simultanée des différentes sous-populations cellulaires au sein des valves fibrocalcifiées n'a étonnement jamais été rapportée dans la littérature. Puisque la Sao concerne essentiellement les personnes âgées et ayant exclu les valves bicuspidées concernées plus précocement par la Sao, il est normal d'observer une différence significative entre l'âge moyen de la population ayant fourni les valves contrôles et celui de la population ayant souffert de Sao sévère.

Par analyse histologique nous montrons que nos valves contrôles sont plus fines, moins cellularisées que nos valves pathologiques et dépourvues de calcifications. D'un point de vue cellulaire, les valves contrôles présentent une population de VICs majoritairement quiescentes bien qu'elles soient davantage activées dans la fibrosa, comme précédemment montré chez le cochon (Thayer, Balachandran et al. 2011). Avec moins de 30 % de VICs activées, nous pouvons affirmer que ces valves sont non sclérosées comme établi par Taylor et coll. sur une série de 13 valves aortiques humaines (Taylor, Allen et al. 2000). Néanmoins, la présence de précurseurs ostéoblastiques et d'obVICs indique l'initiation d'un processus physiopathologique. C'est pourquoi nous appelons ces valves « contrôles » et non pas « saines ». Ainsi, la fibrosa de la valve aortique, davantage concernée par les stress hémodynamiques, possède une veille « aVICs » afin de préserver le tissu valvulaire en cas de lésion. Présentes dans un cadre physiologique, il est néanmoins possible que certaines de ces aVICs évoluent en obVICs. Présentant également des pVICs résidentes en niches sous-

endothéliales de la face ventriculaire et hématopoïétiques au sein de la spongiosa et des cellules progenitrices sous-endothéliales au niveau de la face ventriculaire, nos valves contrôles contiennent tous les phénotypes cellulaires valvulaires.

Fibrosées et calcifiées, les valves pathologiques présentent une architecture tissulaire fortement perturbée. De plus, nous avons montré que ces valves contenaient aussi tous les phénotypes cellulaires valvulaires. Néanmoins, les valves fibrocalcifiées présentent une plus forte proportion d'aVICs qui sont disséminées dans toute la valve. Cette dissémination serait induite par l'EMT des cellules périvasculaires de la face ventriculaire comme leur présence au sein de la ventricularis le laisse penser. De plus, les pVICs résidentes disséminent également dans la valve fibrocalcifiées alors qu'il y a davantage de recrutement de pVICs hématopoïétiques. Ceci serait induit par les nombreuses cytokines inflammatoires sécrétées au niveau de la fibrosa et qui auraient diffusées dans l'ensemble de la valve (Edep, Shirani et al. 2000; Satta, Oiva et al. 2003; Fondard, Detaint et al. 2005; Han and Gotlieb 2012). Les précurseurs ostéoblastiques et les obVICs sont, comme attendu, colocalisés avec les calcifications. Le développement de la Sao impliquerait donc l'ensemble des VICs comme l'ont décrit Liu et coll. dans leur revue de 2007 (Liu, Joag et al. 2007).

Ces observations confirment que les aVICs et les obVICs jouent un rôle crucial dans la progression de la Sao puisque fortement impliquées dans le processus de fibrose et de calcification (Rabkin-Aikawa, Farber et al. 2004; Benton, Kern et al. 2009), que le recrutement intravalvulaire de pVICs hématopoïétiques est associé à l'état physiopathologique de la valve car plus abondant dans les valves fibrocalcifiées (Chalajour, Treede et al. 2004; Gossl, Khosla et al. 2012), que les pVICs résidentes se différencient en cas de lésion valvulaire car moins présentes dans les valves fibrocalcifiées (Liu, Joag et al. 2007) et que les valves contrôles peuvent également être engagées dans un processus physiopathologique puisque les cellules qu'elles contiennent présentent des précurseurs ostéoblastiques.

## **II. Culture *in vitro* des VICs : avantages et inconvénients du modèle.**

Réalisée dès 1974 à partir de valves aortiques et pulmonaires canines (Girinath, Gavin et al. 1974), la culture *in vitro* des VICs a beaucoup évolué que ce soit par les techniques d'isolement cellulaire que par les supports de culture.

Initialement isolées à partir d'un explant tissulaire, les VICs alors considérées comme de simples fibroblastes sont désormais isolées par digestion enzymatique du tissu valvulaire. En effet, la technique de l'explant, consistant à placer le(s) cuspide(s) préalablement fragmentée(s) ou non dans une boîte de culture présente comme inconvénient majeur un risque élevé de contamination de la culture par des cellules endothéliales (Butcher and Nerem 2004; Chen, Cui et al. 2014). Cette technique reste néanmoins utilisée dans le cadre de culture de VICs issues de rongeurs en raison de la taille de leur valve (Chen, Cui et al. 2014). Mise au point en 1987 à partir de valves aortiques porcines, l'isolement des VICs par digestion enzymatique dans la collagénase (2 digestions consécutives de 30 et 60 minutes) permet d'éliminer ces cellules endothéliales ce que nos résultats confirment lors d'une digestion tissulaire plus courte de 60 minutes uniquement (Johnson, Hanson et al. 1987). Nous montrons également que des cellules inflammatoires sont aussi isolées par cette technique. Cependant, le rinçage des boîtes 24h après la mise en culture élimine les débris cellulaires et les cellules non-adhérentes. Les cellules adhérentes comme les macrophages ont été éliminées par le milieu de culture, milieu adapté à la nature (myo)fibroblastique des VICs comme nous l'avons constaté en analysant l'absence de ces cellules après le premier passage.

Les VICs sont le plus souvent caractérisées par l'expression positive de la vimentine et/ou de l' $\alpha$ SMA en raison de leur nature (myo)fibroblastique. Ces marqueurs ne permettent pas de mettre en évidence toutes les sous-populations de VICs. En 2013, l'équipe de Wang a montré sur des cellules issues de valves porcines juste après isolement, grâce à des marqueurs connus de cellules souches embryonnaires (SSEA4), de cellules périvasculaires (NG2) et de précurseurs ostéoblastiques (OB-CDH), la présence de cellules progénitrices s'apparentant aux pVICs résidents, de cellules progénitrices sous-endothéliales et ostéoblastiques en post-digestion de valves porcines (Wang, Sridhar et al. 2013). Ayant appliqué ces marqueurs sur nos cellules, nous avons tout d'abord mis en évidence l'ensemble des VICs et la présence de cellules périvasculaires dans les valves aortiques

humaines contrôles et fibrocalcifiées. Nous avons ensuite analysé leur présence après isolement cellulaire.

En post-digestion, les différents types cellulaires sont retrouvés dans des proportions similaires à celles quantifiées dans les valves à l'exception de la vimentine et des pVICs résidentes. La vimentine est le marqueur communément utilisé pour qualifier les VICs. Sa proportion augmente nettement entre l'analyse tissulaire et la post-digestion. Ceci s'explique par le fait que l'analyse histologique est basée sur le ratio de la surface positive au marqueur sur la surface tissulaire totale. Ainsi, la proportion moyenne de VICs vimentine + au sein des tissus contrôles est de 24 % contre 32 % pour les tissus fibrocalcifiés. En post-digestion, les cellules positives sont rapportées au nombre total de cellules étudiées, ces proportions sont respectivement de 84 et 50 %. Le doublement de la proportion entre l'analyse histologique et la post-digestion s'explique car ces cellules forment des niches cellulaires compactes au sein de la valve contrôle induisant une sous-estimation de leur proportion réelle. Le faible taux observé dans les cellules fibrocalcifiées serait la présence de fragments de collagène qui n'ont pas pu être éliminés par l'étape de filtration. Plus nombreux dans la suspension cellulaire en raison de la fibrose valvulaire importante, ces fragments peuvent fortement encombrer le faible volume (100  $\mu$ L) dans lequel les cellules sont placées pour réaliser la fixation de l'anticorps primaire. Ainsi, l'étape de perméabilisation cellulaire et de fixation des anticorps est compliquée par la présence de ces fragments qui pourraient, partiellement ou complètement, isoler les cellules de l'agent perméabilisant et/ou de l'anticorps primaire.

A ce stade, comme observé par analyse histologique, on constate que les cellules issues des valves fibrocalcifiées présentent une proportion plus importante d'aVICs, de pVICs hématopoïétiques et d'obVICs que les cellules issues de valves contrôles qui présentent davantage de pVICs résidentes et de précurseurs ostéoblastiques. La cohérence de ces résultats avec ceux de l'analyse histologique confirme que la digestion enzymatique des valves permet de récupérer, sans perte, l'ensemble des sous-populations de VICs.

La culture *in vitro* des VICs est le plus souvent réalisée sur plastique et sur collagène. En effet, le collagène étant le principal constituant de l'ECM du tissu valvulaire, ce type de culture a été mise au point dans le but de reproduire les contraintes mécaniques liées à l'ECM afin de rester dans les conditions les plus physiologiques possibles (Rodriguez and Masters 2009; Quinlan and Billiar 2012). Nous montrons que la culture des VICs, qu'elle

soit réalisée sur collagène ou plastique, est un bon modèle cellulaire représentatif des populations de VICs présentes au sein de valves aortiques contrôles et fibrocalcifiées, excepté pour les pVICs hématopoïétiques qui disparaissent soit parce qu'elles sont éliminées par la culture suivant le principe d'isolement préférentiel, soit parce qu'elles se sont différenciées suivant le principe d'induction de différenciation. Nos résultats indiquent que ces cellules se seraient plutôt différenciées en précurseurs ostéoblastiques mais également en cellules périvasculaires. Cette hypothèse s'appuie sur, d'une part, une proportion de précurseurs ostéoblastiques plus importante qu'en post-digestion et d'autre part, par le fait que le FGF et l'EGF sont capable d'induire la différenciation ostéoblastique de cellules souches mésenchymateuses, cellules aux propriétés cellulaires similaires à nos pVICs hématopoïétiques (Kratchmarova, Blagoev et al. 2005). Or, notre milieu de culture contient du FGF et de l'EGF qui auraient ainsi pu induire la différenciation des pVICs hématopoïétiques en précurseurs ostéoblastiques. La présence accrue de cellules périvasculaires sur plastique et non sur collagène serait issue, en partie, de la différenciation de pVICs hématopoïétiques qui serait possible uniquement sur plastique. En effet, la charge négative du plastique de culture pourrait être considérée comme la charge négative de la lame basale de l'endothélium qui est exposée en cas de lésion endothéliale et donc, comme un signal de différenciation en cellules périvasculaires. D'autre part, il a été rapporté que la dégradation de l'ECM était nécessaire à l'induction de l'angiogenèse (Li, Xu et al. 2013), ce qui n'est pas le cas sur notre support collagène. Son intégrité inhiberait donc la différenciation des pVICs hématopoïétiques en cellules périvasculaires. Il a été récemment montré que la culture de cellules souches hématopoïétiques sur support hydrogel constitué de poly(éthylène glycol) conservait leur état non différencié (Cuchiara, Coskun et al. 2015). Déjà utilisé par l'équipe du Dr Anseth pour la culture 2D et 3D des VICs (Mabry, Lawrence et al. 2015), ce support pourrait servir d'alternative pour étudier les pVICs hématopoïétiques dans leur état non différencié.

En culture, les cellules issues des valves contrôles se distinguent de celles issues des valves fibrocalcifiées uniquement par un état d'activation des VICs fibrocalcifiées plus stable au travers des différents passages puisque l'activation des VICs contrôles décroît entre le 3<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> passage mais également par une différenciation ostéoblastique plus importante pour les cellules issues de valves fibrocalcifiées, quel que soit le support. Ceci est parfaitement cohérent avec la nature de l'état physiopathologique des valves dont elles sont issues.

Cependant, quel que soit le support, la culture primaire provoque l'activation des VICs, phénomène bien documenté sur support plastique (Stephens and Grande-Allen 2007; Chen, Cui et al. 2014) et sur collagène dit « rigide ». En effet, l'équipe du Dr. McCulloch a comparé l'activation des VICs en culture sur collagène « souple » obtenu par réalisation d'un gel de collagène ancré ou flottant sur le support plastique et sur collagène « rigide » obtenu par polymérisation direct du collagène sur le support plastique. Le premier support collagène est appelé souple car sa compliance mécanique est 10 fois plus souple que le second support collagène. Ils ont ainsi montré que la culture des VICs sur collagène « souple » réduit fortement l'activation des VICs mais uniquement dans ce cas. Dans le cadre d'un support de collagène rigide tel que nous l'avons utilisé, l'activation des VICs avait été observée dès 5 jours de culture (Pho, Lee et al. 2008).

D'autre part, la culture primaire des VICs, quel que soit leur origine ou le support utilisé, induit leur différenciation ostéoblastique spontanée à l'exception de la culture sur élastine et fibronectine (Benton, Kern et al. 2008). Ces résultats indiquent que ce processus dépend de la nature du substrat et expliqueraient que, *in vivo*, les calcifications formées dans le cadre de la Sao concernent, comme nous l'avons montré et comme ce fut rapporté (Togashi, Tamura et al. 2008), essentiellement la fibrosa, riche en collagène.

Les passages sont également un élément limitant de la culture primaire. Dans notre travail, nous avons montré que le 5<sup>e</sup> passage serait le dernier niveau acceptable de culture avant la sénescence répllicative des cellules (Fridlyanskaya, Alekseenko et al. 2015). Cette sénescence répllicative rapide des VICs, aux caractéristiques de cellules mésenchymateuses, serait la réponse de ces cellules au stress que constitue leur culture primaire. En effet, il a été montré que les cellules souches mésenchymateuses pouvaient développer, en culture, une sénescence répllicative induite par le stress caractérisée par l'arrêt de la prolifération cellulaire et une apoptose nulle comme nous avons pu le constater avec nos VICs (Alekseenko, Zemelko et al. 2014).

Enfin, nos résultats ont permis d'identifier un nouveau marqueur des aVICs : le CD90. Marqueur de myofibroblastes, de cellules endothéliales activées et de différentes cellules souches (Koumas, Smith et al. 2003; Bradley, Ramirez et al. 2009; Chen, Chen et al. 2013), nos résultats obtenus sur les VICs permettent d'avancer l'hypothèse qu'il marque les aVICs. En effet, nous avons déterminé que les cellules endothéliales étaient absentes de nos cultures

et que les fortes proportions de cellules positives pour le CD90 étaient davantage similaires aux aVICs, identifiées par l' $\alpha$ SMA, qu'à celles des différentes sous-populations progénitrices. L'avantage majeur de ce nouveau marqueur des aVICs est que, contrairement à l' $\alpha$ SMA, le CD90 est un marqueur cellulaire membranaire plus facile et plus intéressant à mettre en évidence car ne nécessitant pas de perméabilisation membranaire.

Néanmoins, notre travail comporte 3 limitations. La première porte sur l'élimination des zones de calcification qui a induit une sous-estimation de la population de précurseurs ostéoblastiques et d'obVICs au sein des valves fibrocalcifiées. Nous avons montré dans un essai préalable que les cellules issues de ces zones n'étaient pas viables après leur isolement et il a été montré qu'elles abritent un grand nombre de cellules apoptiques (Yip, Chen et al. 2009). La seconde est que, comme la plupart des études *in vitro* sur les VICs reportées dans la littérature, notre culture primaire est réalisée sous condition statique et isolent les VICs de leur environnement hémodynamique qui, comme présenté dans l'introduction, joue un rôle crucial sur l'activation et la différenciation ostéoblastique de ces cellules. Ainsi, il a été montré que les VICs présentes au sein de valves aortiques porcines placées dans un système pulsatile de culture d'organe conservaient leur viabilité, leur capacité de proliférer et leur capacité à synthétiser de l' $\alpha$ SMA alors que placées en condition statique, le contenu en élastine, GAGs et  $\alpha$ SMA diminuaient avec une mort cellulaire significative (Konduri, Xing et al. 2005). Néanmoins, dans notre travail nous n'avons observé ni diminution de l'expression de l' $\alpha$ SMA ni mort cellulaire au sein de notre culture sur plastique ou sur collagène. Enfin, nous avons réalisé notre culture primaire dans les 2 conditions les plus fréquemment utilisées mais elles sont loin d'être uniques. En effet, le support de collagène peut être réalisé pour présenter différents degrés de rigidité afin de simuler la rigidité progressive de ces fibres au cours de la fibrose de la valve (Pho, Lee et al. 2008). De plus, l'équipe du Dr. Masters étudie le comportement des VICs sur différents supports ayant pour but de simuler les différents éléments de l'ECM de la valve aortique (collagène, hyaluronan, fibronectine et laminine) (Masters, Shah et al. 2004; Rodriguez and Masters 2009). Ainsi, il est possible d'imaginer que la culture sur fibronectine serait similaire au collagène alors que la culture sur laminine, élément de la lame basale, serait davantage favorable aux populations sous-endothéliales telles que les cellules périvasculaires et les pVICs. Quant à l'équipe du Dr. Anseth, elle étudie le comportement des VICs en culture 2D et 3D réalisée grâce à une matrice de polyéthylène glycol (PEG) (Mabry, Lawrence et al. 2015; Mabry,

Payne et al. 2015). Effectuées à partir de valves porcines et présentant différents intérêts comme un maintien plus stable de la quiescence de VICs et la possibilité d'étudier la réponse cellulaires des VICs en fonction de l'ECM sous-jacent, il serait intéressant d'étudier l'évolution des différentes sous-populations de VICs dans ces conditions.

### **III. Transformation *in vitro* des VICs : « mimétisme » des conditions physiopathologiques ?**

Au-delà de l'analyse descriptive des VICs en culture, il est possible d'analyser les différentes transformations des VICs d'un point de vue fonctionnel. En effet, les différentes modifications environnementales appliquées aux VICs sont bien plus proches des conditions physiopathologiques qu'il n'y paraît.

Nous avons ainsi constaté qu'en culture, VICs contrôles et VICs fibrocalcifiées présentent une proportion similaire d'aVICs alors que ces cellules sont considérablement moins présentes au sein des valves contrôles et des cellules isolées de celle-ci. Ce phénomène, induit dans ce cas par la culture, est en fait représentatif de ce qui se passe au sein d'une valve ayant subi une lésion tissulaire. En effet, d'un point de vue cellulaire, la perte d'adhésion avec le collagène est interprétée de la même manière par la qVICs, qu'elle soit induite par une lésion tissulaire ou par la collagénase utilisée pour la digestion valvulaire. En effet, l'interaction des VICs avec les différents éléments de l'ECM fait partie de la voie de mécano-transduction centralisée qui permet aux VICs de réagir instantanément à une perte d'intégrité de l'ECM (Latif, Sarathchandra et al. 2005; Chester, El-Hamamsy et al. 2014). L'activation de cette voie de mécano-transduction par perte d'adhésion avec l'ECM induit alors une expression accrue d' $\alpha$ -SMA, de MMPs et de collagène afin de réparer au plus la lésion tissulaire (Balachandran, Sucosky et al. 2009). Néanmoins, l'expression de ces protéines nécessite du temps expliquant pourquoi, en post-digestion, les cellules issues des valves contrôles et celles issues de valves fibrocalcifiées présentent encore des proportions nettement différentes d'aVICs alors qu'en culture, elles sont similaires. En culture effectuée sur plastique et sur collagène, nous avons constaté que cette activation est maintenue potentiellement pour 3 raisons :

- les passages cellulaires sont effectués avec de la trypsine qui isole les VICs les uns des autres en rompant les jonctions cellulaires telles que celles impliquant des cadhérines. Or, la perturbation de ces jonctions libèrent la  $\beta$ -caténine qui peut alors

migrer jusqu'au noyau afin d'induire l'acquisition d'un phénotype pro-fibrosant et pro-calcifiant (Heuberger and Birchmeier 2010).

- les aVICs déjà présentes exprimeraient du TGF- $\beta$ 1, cytokine inflammatoire connue pour induire l'activation des VICs (Rabkin-Aikawa, Farber et al. 2004).
- Enfin, nous avons réalisé notre support en collagène par polymérisation direct du collagène sur le support plastique ; ce que l'équipe du Dr. McCulloch a déterminé comme un support en collagène « rigide » (Pho, Lee et al. 2008). Or, cette équipe a rapporté que ce support s'apparente davantage à l'ECM des valves aortiques fibrosées puisque la structuration du collagène dans ces valves présente une plus forte rigidité que celle présente au sein des valves aortiques normales. Or il a été rapporté qu'une rigidité accrue du substrat des VICs promeut leur activation par amplification de l'expression d' $\alpha$ -SMA (Yip et al. 2009).

En plus, l'activation des VICs, nous avons également constaté que les VICs contrôles et fibrocalcifiées présentaient une proportion accrue d'obVICs au cours des différents passages. Ce phénomène est d'autant plus vrai pour les VICs issues de valves fibrocalcifiées puisqu'elles ont préalablement été exposées à un environnement pro-calcifiant. Il est donc fort probable que ces cellules soient plus aptes à répondre à différents stimuli capables d'induire la différenciation ostéoblastique. Cette transformation *in vitro*, que ce soit sur plastique ou sur collagène, est très probablement associée à l'activation des VICs puisque le clivage des jonctions cadhérines, similaire à ce qui se passe dans un contexte de lésion tissulaire, libère la  $\beta$ -caténine, co-activateur transcriptionnel, entre autre, de la voie de signalisation Wnt - Lrp5 -  $\beta$ cat qui induit la différenciation ostéoblastique (Rajamannan, Subramaniam et al. 2005; Caira, Stock et al. 2006). De plus, la potentielle expression de TGF- $\beta$ 1 par les VICs activées amplifierait cette transformation *in vitro* puisque cette cytokine induit l'expression de l'OB-CDH par les aVICs *via* la voie de signalisation Erk1/2. Or la surexpression de cette cadhérine correspond à une des étapes-clefs de la différenciation ostéoblastique *via* l'activation de la voie Wnt (Hutcheson, Chen et al. 2013). Néanmoins, bien que cette cadhérine favorise la différenciation ostéoblastique *via* une transmission des forces intracellulaires accrue, nos résultats montrent que l'expression de l'OB-CDH serait effectivement impliquée dans la différenciation ostéoblastique des VICs cultivées sur collagène. En effet, l'évolution de l'expression de l'OB-CDH sur collagène est similaire à celle de l'OMD, protéine exprimée par les cellules ostéoblastiques alors que ce n'est pas le

cas sur plastique. La culture s'effectuant en sous-confluence, l'absence de contact cellulaire explique, sans doute, la faible présence de jonctions intercellulaires impliquant l'OB-CDH. Notre culture collagène ayant une forte rigidité, l'expression de l'OB-CDH est sans doute favorisée puisque cette cadhérine est également un régulateur mécanosensitif de la fibrose (Hinz, Pittet et al. 2004). Il a été récemment montré qu'un environnement chargé négativement telle que la culture plastique prévient la différenciation ostéoblastique des VICs comme cela semble être le cas pour nos VICs contrôles (Rush, Coombs et al. 2015). Enfin, la différenciation ostéoblastique accrue des VICs pourrait également être induite par la différenciation des pVICs hématopoïétiques qui disparaissent quelque soit le support de culture. En effet, il a été montré que ces cellules sont capables de se différencier en obVICs dans un environnement similaire à celui de la valve fibrocalcifiées sans doute via la sécrétion de TGF- $\beta$ 1 (Leskela, Satta et al. 2006; Chen, Yip et al. 2009; Hajdu, Romeo et al. 2011).

Les cellules périvasculaires, quant à elles, sont préférentiellement cultivées sur plastique où elles prolifèrent (Boscolo, Mulliken et al. 2013), ce qui explique en partie pourquoi elles sont si abondantes. La différenciation de pVICs hématopoïétiques en cellules périvasculaires pourrait également être envisagée pour la culture sur plastique en considérant sa charge négative qui serait donc perçue comme un signal de différenciation en cellules périvasculaires. D'autre part, ces cellules périvasculaires étant impliquées dans le processus d'angiogenèse, l'absence d'ECM pourrait être considérée par ces cellules comme la dégradation de l'ECM nécessaire à l'induction de l'angiogenèse (Li, Xu et al. 2013). Au contraire du support plastique, l'intégrité du support collagène inhiberait la différenciation des pVICs hématopoïétiques en cellules périvasculaires. Cependant, nous avons remarqué qu'entre le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> passage, la proportion des cellules périvasculaires issues de valves contrôles et fibrocalcifiées diminuait de façon notable avant de se stabiliser entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> passage. Ceci peut sans doute s'expliquer par l'utilisation de la trypsine pour effectuer le passage qui va cliver les jonctions cellulaires de type N-cadhérine. Ce clivage libère, comme précédemment citée, la  $\beta$ -caténine qui, par activation de la voie Wnt, peut induire le processus d'EMT. De plus, la possible expression de TGF- $\beta$ 1 par les aVICs est également capable d'induire ce processus tout comme l'expression de BMPs par les obVICs. Ce processus serait ainsi initié en réponse à la perception d'une perte de l'intégrité tissulaire valvulaire, simulée ici par l'absence d'ECM (Gonzalez and Medici 2014).

Enfin, l'évolution des pVICs résidentes tendrait à confirmer le « mimétisme » physiopathologique de la culture des VICs, que ce soit sur plastique ou sur collagène. Il y a tout d'abord, de manière indépendante au support de culture, la présence de FGF. Exprimé au sein de la valve aortique en cas de lésion tissulaire, ce facteur de croissance induit la voie de survie et de prolifération cellulaire Akt au sein des aVICs. Il est capable d'induire la différenciation ostéoblastique de cellules souches mésenchymateuses telles que les pVICs hématopoïétique mais est également crucial dans le maintien de la pluripotentialité de cellules souches embryonnaires telles que les pVICs résidentes tout en stimulant leur prolifération (Kratchmarova, Blagoev et al. 2005, Ludwig, Levenstein et al. 2006, Han and Gotlieb 2012). La présence de FGF dans notre milieu de culture induirait donc un environnement similaire à celui présent dans la valve aortique endommagée et expliquerait le maintien et, même, l'accroissement de la population pVICs résidentes en culture entre leur isolement et l'analyse des différents passages. De manière dépendante à nos supports de culture, il a été montré que la culture de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) à partir de corps embryoides de souris réalisés sur collagène de type I soutient davantage la différenciation de ces cellules en cellules cardiaques ou neuronales que la culture de ces cellules sur plastique (Macri-Pellizzeri, Pelacho et al. 2015). Ainsi, nos pVICs résidentes proliféreraient sous l'induction du FGF et se différencieraient davantage sur collagène en raison de sa rigidité.

Pour l'ensemble de ces raisons, on peut conclure que 1) les phénomènes de transformation cellulaire observés dans la culture primaire des VICs sont essentiellement dus à la forte réactivité de ces cellules et 2) nos conditions de culture sont assez proches de l'environnement physiopathologique de la Sao.

#### **IV. Facteur tissulaire, VICs et sténose aortique.**

Ayant observé, par immunohistochimie, une expression du FT plus forte au sein des valves fibrocalcifiées par rapport aux valves contrôles, nous avons confirmé ce résultat par analyse de l'expression du FT (ARNm, expression protéique et activité) des broyats de valves. Ainsi, l'expression du FT est en moyenne 2 fois plus forte au sein des valves pathologiques que dans les valves contrôles. Néanmoins, l'analyse distincte des zones tissulaires et calcifiées de ces valves indique que cette expression élevée concerne surtout les zones calcifiées comme nous l'avons montré dans un précédent travail (Breyne, Juthier et al. 2010) ce qui nous permet d'émettre l'hypothèse que le FT serait impliqué dans le

processus de calcification.

Les VICs isolées de ces valves et cultivées en milieu standard expriment constitutivement le FT (ARNm, expression protéique et activité) avec une expression 2 fois supérieure pour les VICs issues des valves fibrocalcifiées. Mise en évidence pour la première fois en histologie dans des zones dépourvues d'infiltrats macrophagiques de valves aortiques sténosées (Natorska, Marek et al. 2009), nous confirmons ainsi que les VICs, tout comme les fibroblastes de la paroi des vaisseaux sanguins (Daubie, Pochet et al. 2007), expriment constitutivement du FT ; probablement dans le but de protéger l'intégrité du tissu valvulaire en cas de brèche endothéliale.

Néanmoins, cette différence d'expression entre les valves contrôles et les valves pathologiques semble indiquer que le FT jouerait également un rôle dans le développement de la pathologie. Des VICs contrôles mise en présence d'IL1 $\beta$ , cytokine inflammatoire fortement présente au cours du développement de la Sao (Kaden, Dempfle et al. 2003), expriment davantage de FT. Son expression est donc inductible dans les VICs renforçant l'hypothèse de son rôle dans le développement de la pathologie. L'expression du FT ne serait pas seulement induite par l'inflammation du tissu valvulaire mais également par l'environnement procalcifiant. Nous avons ainsi montré que les VICs contrôles cultivées en milieu procalcifiant exprimaient fortement et précocement du FT.

De plus, nous avons montré qu'en présence du FVII, le FT exprimé par les VICs contrôles, préalablement stimulées avec l'IL1 $\beta$ , était capable, d'une part, d'initier la cascade de coagulation et, d'autre part, d'induire l'expression de fibronectine, de la  $\beta$ -caténine et de RUNX2.

L'activation de la coagulation expliquerait pourquoi il n'est pas rare d'observer la présence d'un thrombus dans la valve fibrocalcifiée (Stein, Sabbah et al. 1977). De plus, la thrombine générée favoriserait la calcification du tissu valvulaire car, colocalisée avec les calcifications et l'ostéopontine, la thrombine est capable de cliver le fragment N-terminal de l'ostéopontine qui possède des propriétés pro-calcifiantes (Rajamannan, Subramaniam et al. 2003; Breyne, Juthier et al. 2010).

Néanmoins, comme le montre l'expression induite de la  $\beta$ -caténine et de RUNX2, l'implication du FT dans le processus de calcification est également induite par l'activation

de voies de signalisation cellulaire. Nos résultats semblent indiquer que la voie de signalisation cellulaire impliquée est celle médiée par le  $\beta$ -caténine, connue pour être impliquée dans la différenciation ostéoblastique des VICs (Li, Xu et al. 2013).

L'expression induite de la fibronectine indique que le FT est également impliqué dans le processus de fibrose. Ainsi, nos résultats préliminaires semblent indiquer que la voie de signalisation cellulaire impliquée dans cette expression est la voie Smad2. En effet, celle-ci est connue pour être impliquée dans la fibrose de nombreux tissus comme le tissu pulmonaire en cas d'asthme et le tissu rénal (Lan and Chung 2012; Royce, Cheng et al. 2012). De plus, il a été montré que l'expression de PAI-1 par des CMLs vasculaires était induite par la voie de signalisation Smad2/3 (Samarakoon and Higgins 2008). La fibrose induite par les VICs *via* la synthèse de la fibronectine est probablement maintenue par l'inhibition de la fibrinolyse. Enfin, nos résultats préliminaires semblent indiquer que l'activation de ces voies de signalisation passe directement par le FT *via* la formation du complexe FT-FVIIa et la phosphorylation de son domaine intracytoplasmique *via* la phospholipase C et la PCK $\alpha$  ou indirectement *via* l'activation du récepteur PAR-2. En effet, nous avons mis en évidence l'expression de ce récepteur par les VICs par cytométrie en flux (collaboration avec le Pr. Smadja). Comme présenté dans le cadre de la fibrose pulmonaire idiopathique, l'axe PAR2-FT-FVIIa pourrait être impliqué dans le processus pathologique de fibrose tissulaire (Wygrecka, Kwapiszewska et al. 2011).

Pour ce qui est des limites de notre travail, elles sont essentiellement liées au besoin de définir plus précisément les voies de signalisation induite par le complexe FT-FVIIa seul ou *via* PAR2 mais également de confirmer l'implication du FT dans un modèle *in vivo* de Sao.

Afin de définir ces voies de signalisation, nous travaillons actuellement à la mise au point de la technique de siRNA pour réaliser une inhibition complète du FT. L'analyse des voies de signalisation modifiées par cette inhibition permettra d'identifier l'ensemble des voies de signalisation médiées par le FT. En parallèle, la culture des VICs en présence de FVII et d'un antagoniste de PAR2 permettra d'isoler les voies de signalisation induites exclusivement par le domaine intracytoplasmique du FT. Enfin, la culture des VICs en présence d'un agoniste de PAR2 permettra d'identifier les voies de signalisation induites exclusivement par l'activation de ce récepteur.

Quant aux modèles *in vivo* de Sao, ceux-ci sont peu nombreux et souvent plutôt associés à une sclérose valvulaire (Miller, Weiss et al. 2011). Ainsi chez les souris apo E<sup>-/-</sup>, le développement de la sclérose aortique est spontané et induit par le vieillissement des animaux (Tanaka, Sata et al. 2005). Pour que ces souris développent une sténose aortique, il faut les traiter avec des injections intrapéritonéales quotidiennes de leptine à forte dose pendant 8 semaines (Zeadin, Butcher et al. 2009). Ce modèle n'a pas été envisagé car peu similaire à la physiopathologie de la Sao. Le modèle de sclérose aortique chez le lapin développé au sein de notre équipe (Marechaux, Corseaux et al. 2009) est difficilement utilisable dans le cadre de l'étude de la modulation pharmacologique du FT. En effet, la dose des molécules pharmacologiques administrées étant dépendante du poids de l'animal, travailler avec le lapin consommerait une quantité trop importante de ces molécules. Le modèle basé sur un régime enrichi en vitamine D2 de 12 semaines chez des rats Wistar, mis en place dans le laboratoire par Jérôme Soquet lors de son master 2, a eu peu d'impact sur la valve aortique contrairement à ce qui avait été rapporté dans la littérature (Roosens, Droogmans et al. 2011),; les calcifications concernant essentiellement la racine aortique et les artères de moyen et gros calibre. Quant au régime enrichi en adénine (0,5 % d'adénine et 1,5% de phosphate, 12 semaines) chez les rats Wistar, induisant une insuffisance rénale par résorption accrue de la vitamine D (Shuvy, Abedat et al. 2008), Agnès Mugnier a montré, lors de son master 2, qu'il ne suffisait pas à induire la calcification du tissu valvulaire. Néanmoins, en couplant ces 2 modèles (8 semaines de régime enrichi en adénine suivi de 4 semaines de régime enrichi en vitamine D2), elle est parvenue à mettre en évidence la présence de calcifications dans le tissu valvulaire. L'étude cinétique de ce modèle animal permettrait d'identifier l'implication du FT dans le développement de la Sao à un stade précoce, tardif ou continu.

## **V. Discussion générale.**

Les travaux présentés nous permettent d'établir des liens entre les différents résultats obtenus et résumés dans la **figure 26**.

Nous avons tout d'abord validé les modèles de culture de VICs les plus fréquemment utilisés et sélectionné la culture de VICs sur plastique à des passages précoces car représentatif de l'hétérogénéité cellulaire observée dans les valves dont elles sont issues. Néanmoins, en raison de l'activation de la voie de mécano-transduction centralisée, nous

avons montré que les VICs contrôles évoluent rapidement en culture en faveur d'une hétérogénéité cellulaire davantage similaire à celle présente dans les phases précoces de la Sao : forte activation des VICs et faible présence de précurseurs ostéoblastiques et d'obVICs. Néanmoins, en absence de toute autre forme de stimulation, nous avons constaté que les VICs issues de valves contrôles exprimaient constitutivement moins de FT que les VICs fibrocalcifiées ; qui diffèrent dans ces conditions uniquement dans leurs proportions de précurseurs ostéoblastiques. Cette première observation semble montrer un lien entre FT et calcification qu'il faudra confirmer par sélection spécifique de cette population.

Mis en présence d'IL-1 $\beta$ , cytokine inflammatoire fortement présente au sein de valve aortique fibrocalcifiée, les VICs contrôles expriment davantage de FT indiquant que l'expression de ce FT par les VICs peut être induite en cas de réaction inflammatoire. Ce processus étant précocement initié dans le cadre de la Sao, le FT pourrait ainsi être impliqué dans les stades précoces de la pathologie.

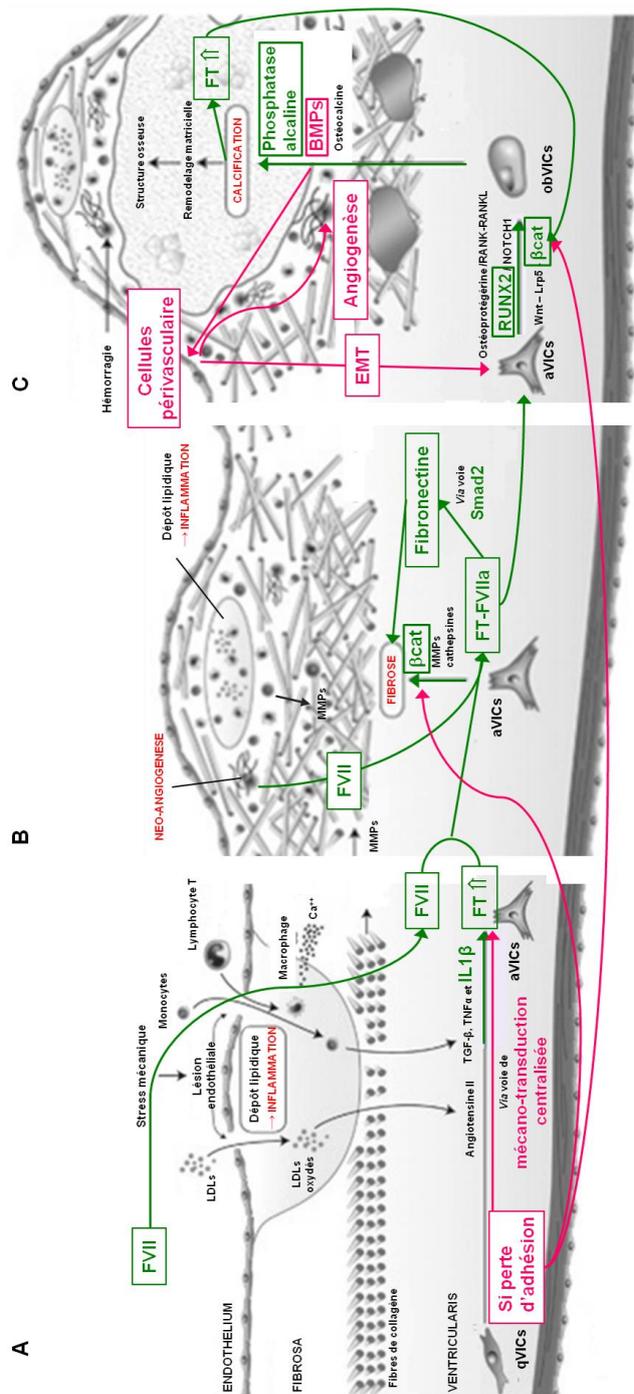
Nos conditions de culture primaire de VICs contrôles étant similaire à une situation de lésion du tissu valvulaire (perte d'interaction avec l'ECM, prolifération des cellules périvasculaires et activation des VICs), nous avons mis ces cellules en présence de FVII. Nous avons ainsi étudié l'impact de la formation du complexe FT-FVIIa sur la signalisation des VICs. Nous avons ainsi montré que les VICs contrôles exprimaient davantage de  $\beta$ -caténine, co-activateur transcriptionnel impliqué dans l'initiation de voie cellulaire impliquée dans les processus de fibrose et de calcification. L'implication du FT dans l'induction de ces processus *via* la formation du complexe FT-FVIIa a ensuite été confirmée par l'analyse de l'expression de la fibronectine et de RUNX2. Bien que devant être encore confirmé, nos résultats préliminaires indiquent que la fibrose serait initiée en partie *via* la voie de signalisation Smad2. La surexpression de RUNX2 semble, quant à elle, indiquer une implication dans le processus de calcification par différenciation ostéoblastique des VICs.

Il est à noter que, si dans un premier temps, la présence de FVII au sein du tissu valvulaire est permise par les brèches endothéliales, cette présence est par la suite renforcée par l'induction du processus d'angiogenèse. Or, nous avons observé *in vitro* la prolifération et la différenciation des cellules périvasculaires connues pour être impliquées dans l'initiation de l'angiogenèse mais également pour subir le processus d'EMT pouvant être induit par les BMPs exprimées par les obVICs.

Nous avons ensuite décidé d'étudier l'impact de l'expression du FT dans des conditions

plus proches des stades tardifs de la Sao. Pour se faire, nous avons incubé nos VICs dans un milieu pro-calcifiant qui a pour but d'imiter l'environnement pro-calcifiant présent au sein de valves aortiques sténosées. Nos résultats préliminaires ont ainsi montré que le FT doit, plus que probablement, être également impliqué dans les phases tardives de la pathologie puisque son ARNm est considérablement augmenté au bout de 21 jours d'incubation dans ce milieu et associé à l'expression accrue de marqueurs ostéoblastiques (RUNX2 et phosphatase alcaline)

En conclusion, nos analyses semblent indiquer que le FT serait impliqué dans les phases précoces et tardives de la Sao par induction des processus de fibrose et de calcification.



**Figure 26 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de la validation de la culture primaire des VICs (rose) et l'étude de l'impact de la voie du FT sur les VICs (vert).**

Notre culture de VICs s'apparente à un stade précoce du développement de la Sao : la lésion endothéliale (A) car les VICs s'activent en grand nombre en raison de l'absence d'interactions inter-cellulaires. Exprimer constitutivement le FT, l'incubation des VICs avec l'IL1 $\beta$  amplifie fortement cette expression. Ligand du FT, le FVII pénètre dans le tissu valvulaire lésé *via* les lésions endothéliales (A) et les néo-vaisseaux sanguins formés (B). L'induction par le complexe FT-FVIIa de voies de signalisation pro-fibrosante (Smad2 et  $\beta$ -caténine) et pro-calcifiante (RUNX2 et  $\beta$ -caténine) est FT-dépendante (B et C). De plus, le FT semble être impliqué dans les phases tardives du développement de la Sao (C) puisque l'incubation de VICs en milieu pro-calcifiant montre une expression du FT amplifiée lorsque la différenciation ostéoblastique des VICs est plus forte. Adaptée de Dweck, Boon et coll. 2012.

## CONCLUSION.

Dans le cadre du suivi longitudinal des VICs depuis les valves aortiques humaines contrôles et pathologiques jusqu'à la culture *in vitro* réalisée sur plastique et sur collagène, nous avons tout d'abord montré que les différentes sous-populations étaient présentes au sein de ces valves avec des localisations et des proportions différentes selon l'état physiopathologique du tissu. Après digestion enzymatique de la valve, elles sont toutes retrouvées mais lors de la mise en culture, les pVICs hématopoïétiques ont disparu, quel que soit l'origine des VICs et quel que soit le support de culture. Nous avons validé le modèle de culture primaire des VICs. Nous avons également établi une série d'anticorps, validée en histologie et en cytométrie, utile pour identifier l'ensemble des sous-populations de VICs.

Cependant, nous avons également mis en lumière ses limites : l'absence des pVICs hématopoïétique, l'activation et la différenciation ostéoblastique spontanée des VICs, même si cette dernière est plus importante pour les VICs issues des valves fibrocalcifiées. Au vu de nos résultats, il est donc nécessaire de travailler à des passages précoces.

Dans le cadre de l'étude de l'implication du FT dans le développement de la Sao, nous avons montré sa colocalisation avec la thrombine et les calcifications de valves pathologiques. A partir de la culture primaire de VICs issues de valves humaines contrôles et pathologiques, nous avons montré que l'expression et l'activité du FT étaient constitutivement plus importantes pour les VICs pathologiques et que son expression pouvait être induite par l'IL1 $\beta$ . De plus, l'activation du FT, en présence de son ligand le facteur VII, induit l'expression de fibronectine et de RUNX2, impliquées dans la fibrose et la calcification de la valve aortique. Cette étude suggère ainsi que le FT produit par les VICs est un médiateur clef dans le développement de la sténose aortique. La mise en place d'un modèle *in vivo* de Sao est nécessaire afin de valider définitivement une hypothèse telle que l'implication du FT dans le développement de la pathologie.

## PERSPECTIVES

En perspective, sur base des résultats préliminaires obtenus en milieu procalcifiant, nous souhaitons tout d'abord étudier l'impact de ce milieu procalcifiant, imitant l'environnement extracellulaire présent au sein des valves fibrocalcifiées, sur les VICs afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires précis impliqués dans le processus de calcification. Plus précisément, sur base des marqueurs validés par notre étude longitudinale, nous étudierons l'évolution des différents sous-types de VICs et leur propension à subir une différenciation ostéoblastique. Du point de vue moléculaire, nous étudierons plus particulièrement les modulations de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine mais également celles de l'apoptose pour distinguer la part réelle de la différenciation ostéogénique et de la calcification dystrophique. En parallèle, afin de déterminer si la présence de cet environnement a des implications différentes de la présence adjacente de calcifications, nous développerons la culture des VICs sur une matrice constituée d'hydroxyapatite, constituant principal des calcifications présentes au sein des valves fibrocalcifiées. L'analyse de l'évolution cellulaire sera faite grâce aux marqueurs validés par notre étude longitudinale. Le FT et ses voies de signalisation seront les mécanismes moléculaires étudiés préférentiellement au vu de la forte augmentation d'expression du FT induite par le milieu procalcifiant. Enfin, sur base des résultats obtenus par l'analyse transcriptomique des VICs réalisée par notre équipe (puce Affymetrix), il serait intéressant d'étudier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

En ce qui concerne le FT, nous souhaitons explorer le modèle murin de Sao basé sur un régime d'abord enrichi en adénine (0,5 % d'adénine et 1,5 % de phosphate, 8 semaines) induisant une insuffisance rénale avec résorption accrue de vitamine D suivi d'un régime enrichi en vitamine D2 (25 000 UI/kg, 4 semaines). La présence de calcifications intravalvulaires est encourageante et ce modèle permettrait d'étudier, *in vivo*, l'implication du FT dans le développement de la Sao. En outre, selon les voies de signalisation induites par le FT *via* son domaine intracytoplasmique et/ou *via* l'activation de PAR2, il serait possible d'étudier l'impact de la modulation de l'activité du FT sur le développement de la Sao par administration de molécules pharmacologiques telles que le FFR-VIIa (ASIS, Novo Nordisk), inhibiteur compétitif du FVIIa, l'apixaban (Eliquis<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb), inhibiteur du FXa et/ou la bivalirudine (Angiox<sup>®</sup>, The Medicines Company UK), inhibiteur de la thrombine.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, K., M. Shoji, et al. (1999). "Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(15): 8663-8668.
- Adams, D. H., J. J. Popma, et al. (2014). "Transcatheter aortic-valve replacement with a self-expanding prosthesis." The New England journal of medicine **371**(10): 967-968.
- Agmon, Y., B. K. Khandheria, et al. (2001). "Aortic valve sclerosis and aortic atherosclerosis: different manifestations of the same disease? Insights from a population-based study." Journal of the American College of Cardiology **38**(3): 827-834.
- Ahamed, J. and W. Ruf (2004). "Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain." The Journal of biological chemistry **279**(22): 23038-23044.
- Ahamed, J., H. H. Versteeg, et al. (2006). "Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(38): 13932-13937.
- Aicher, D., C. Urbich, et al. (2007). "Endothelial nitric oxide synthase in bicuspid aortic valve disease." The Annals of thoracic surgery **83**(4): 1290-1294.
- Aikawa, E., P. Whittaker, et al. (2006). "Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering." Circulation **113**(10): 1344-1352.
- Akahane, K., K. Okamoto, et al. (2001). "Inhibition of factor Xa suppresses the expression of tissue factor in human monocytes and lipopolysaccharide-induced endotoxemia in rats." Surgery **130**(5): 809-818.
- Akahori, H., T. Tsujino, et al. (2011). "Intraleaflet haemorrhage is associated with rapid progression of degenerative aortic valve stenosis." Eur Heart J **32**(7): 888-896.
- Albrechtsen, T., B. B. Sorensen, et al. (2007). "Transcriptional program induced by factor VIIa-tissue factor, PAR1 and PAR2 in MDA-MB-231 cells." Journal of thrombosis and haemostasis : JTH **5**(8): 1588-1597.
- Alekseenko, L. L., V. I. Zemelko, et al. (2014). "Sublethal heat shock induces premature senescence rather than apoptosis in human mesenchymal stem cells." Cell stress & chaperones **19**(3): 355-366.
- Armesilla, A. L., E. Lorenzo, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor of activated T cells in human endothelial cells: a role for tissue factor gene expression." Mol Cell Biol **19**(3): 2032-2043.
- Armstrong, E. J. and J. Bischoff (2004). "Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation." Circ Res **95**(5): 459-470.
- Audet, A., N. Cote, et al. (2012). "Amyloid substance within stenotic aortic valves promotes mineralization." Histopathology **61**(4): 610-619.
- Bach, R. R. (2006). "Tissue factor encryption." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **26**(3): 456-461.

- Back, M., T. C. Gasser, J. B. Michel and G. Caligiuri (2013). "Biomechanical factors in the biology of aortic wall and aortic valve diseases." Cardiovasc Res **99**(2): 232-241.
- Balachandran, K., P. Sucusky, H. Jo and A. P. Yoganathan (2009). "Elevated cyclic stretch alters matrix remodeling in aortic valve cusps: implications for degenerative aortic valve disease." Am J Physiol Heart Circ Physiol **296**(3): H756-764.
- Bella, J. N., W. Tang, et al. (2007). "Genome-wide linkage mapping for valve calcification susceptibility loci in hypertensive sibships: the Hypertension Genetic Epidemiology Network Study." Hypertension **49**(3): 453-460.
- Belting, M., M. I. Dorrell, et al. (2004). "Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling." Nature medicine **10**(5): 502-509.
- Benton, J. A., H. B. Kern, et al. (2008). "Substrate properties influence calcification in valvular interstitial cell culture." J Heart Valve Dis **17**(6): 689-699.
- Benton, J. A., H. B. Kern, et al. (2009). "Statins block calcific nodule formation of valvular interstitial cells by inhibiting alpha-smooth muscle actin expression." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **29**(11): 1950-1957.
- Bergler-Klein, J., U. Klaar, et al. (2004). "Natriuretic peptides predict symptom-free survival and postoperative outcome in severe aortic stenosis." Circulation **109**(19): 2302-2308.
- Bettex, D. A., R. Pretre, et al. (2014). "Is our heart a well-designed pump? The heart along animal evolution." Eur Heart J **35**(34): 2322-2332.
- Bini, A., J. J. Fenoglio, Jr., et al. (1989). "Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis. Use of monoclonal antibodies." Arteriosclerosis **9**(1): 109-121.
- Binkert, C., M. Demetriou, et al. (1999). "Regulation of osteogenesis by fetuin." The Journal of biological chemistry **274**(40): 28514-28520.
- Bischoff, J. and E. Aikawa (2011). "Progenitor cells confer plasticity to cardiac valve endothelium." J Cardiovasc Transl Res **4**(6): 710-719.
- Bogatkevich, G. S., E. Tourkina, et al. (2001). "Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway." The Journal of biological chemistry **276**(48): 45184-45192.
- Borensztajn, K., M. P. Peppelenbosch, et al. (2008). "Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease." Trends Mol Med **14**(10): 429-440.
- Borissoff, J. I., S. Heeneman, et al. (2010). "Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state." Circulation **122**(8): 821-830.
- Borissoff, J. I., H. M. Spronk, et al. (2011). "The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis." N Engl J Med **364**(18): 1746-1760.
- Boscolo, E., J. B. Mulliken, et al. (2013). "Pericytes from infantile hemangioma display proangiogenic properties and dysregulated angiopoietin-1." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **33**(3): 501-509.
- Bostrom, K. I., N. M. Rajamannan, et al. (2011). "The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens." Circ Res **109**(5): 564-577.

- Bowen, C. J., J. Zhou, et al. (2015). "Cadherin-11 coordinates cellular migration and extracellular matrix remodeling during aortic valve maturation." Dev Biol.
- Boys, C. W., A. Miller, et al. (1993). "Crystallization and preliminary X-ray analysis of human tissue factor extracellular domain." J Mol Biol **234**(4): 1263-1265.
- Bradley, J. E., G. Ramirez, et al. (2009). "Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype." Biofactors **35**(3): 258-265.
- Breyne, J., F. Juthier, et al. (2010). "Atherosclerotic-like process in aortic stenosis: activation of the tissue factor-thrombin pathway and potential role through osteopontin alteration." Atherosclerosis **213**(2): 369-376.
- Bugge, T. H., Q. Xiao, et al. (1996). "Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(13): 6258-6263.
- Butcher, J. T., G. J. Mahler, et al. (2011). "Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions." Advanced drug delivery reviews **63**(4-5): 242-268.
- Butcher, J. T. and R. R. Markwald (2007). "Valvulogenesis: the moving target." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **362**(1484): 1489-1503.
- Butcher, J. T. and R. M. Nerem (2004). "Porcine aortic valve interstitial cells in three-dimensional culture: comparison of phenotype with aortic smooth muscle cells." The Journal of heart valve disease **13**(3): 478-485; discussion 485-476.
- Butcher, J. T. and R. M. Nerem (2006). "Valvular endothelial cells regulate the phenotype of interstitial cells in co-culture: effects of steady shear stress." Tissue engineering **12**(4): 905-915.
- Butcher, J. T., A. M. Penrod, et al. (2004). "Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **24**(8): 1429-1434.
- Butcher, J. T., S. Tressel, et al. (2006). "Transcriptional profiles of valvular and vascular endothelial cells reveal phenotypic differences: influence of shear stress." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **26**(1): 69-77.
- Caira, F. C., S. R. Stock, et al. (2006). "Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation." Journal of the American College of Cardiology **47**(8): 1707-1712.
- Camera, M., M. Frigerio, et al. (2003). "Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(9): 1690-1696.
- Camerer, E., J. A. Rottingen, et al. (1999). "Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the egr-1 gene." The Journal of biological chemistry **274**(45): 32225-32233.
- Carlsen, E., A. Flatmark, et al. (1988). "Cytokine-induced procoagulant activity in monocytes and endothelial cells. Further enhancement by cyclosporine." Transplantation **46**(4): 575-580.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-257.

- Carmeliet, P., N. Mackman, et al. (1996). "Role of tissue factor in embryonic blood vessel development." Nature **383**(6595): 73-75.
- Chakraborty, S., M. D. Combs, et al. (2010). "Transcriptional regulation of heart valve progenitor cells." Pediatric cardiology **31**(3): 414-421.
- Chalajour, F., H. Treede, et al. (2004). "Angiogenic activation of valvular endothelial cells in aortic valve stenosis." Experimental cell research **298**(2): 455-464.
- Chambers, R. C., K. Dabbagh, et al. (1998). "Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1." The Biochemical journal **333** ( Pt 1): 121-127.
- Chambers, R. C., P. Leoni, et al. (2000). "Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1." The Journal of biological chemistry **275**(45): 35584-35591.
- Chan, K. L. (2003). "Is aortic stenosis a preventable disease?" Journal of the American College of Cardiology **42**(4): 593-599.
- Chan, K. L., K. Teo, et al. (2010). "Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial." Circulation **121**(2): 306-314.
- Chan, M. W., B. Hinz, et al. (2010). "Mechanical induction of gene expression in connective tissue cells." Methods Cell Biol **98**: 178-205.
- Charest, A., A. Pepin, et al. (2006). "Distribution of SPARC during neovascularisation of degenerative aortic stenosis." Heart **92**(12): 1844-1849.
- Charitos, E. I. and H. H. Sievers (2013). "Anatomy of the aortic root: implications for valve-sparing surgery." Ann Cardiothorac Surg **2**(1): 53-56.
- Chen, H., W. Cui, et al. (2014). "Isolation and culture of rat aortic valve interstitial cells." Anatolian journal of cardiology.
- Chen, J., A. Bierhaus, et al. (2001). "Tissue factor--a receptor involved in the control of cellular properties, including angiogenesis." Thrombosis and haemostasis **86**(1): 334-345.
- Chen, J. H., C. Y. Yip, et al. (2009). "Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential." Am J Pathol **174**(3): 1109-1119.
- Chen, P. L., W. S. Chen, et al. (2013). "Diagnostic utility of neural stem and progenitor cell markers nestin and SOX2 in distinguishing nodal melanocytic nevi from metastatic melanomas." Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc **26**(1): 44-53.
- Chester, A. H., I. El-Hamamsy, et al. (2014). "The living aortic valve: From molecules to function." Glob Cardiol Sci Pract **2014**(1): 52-77.
- Chu, A. J., U. O. Raphael, et al. (1999). "Compound 48/80 suppresses monocytic tissue factor-initiated extrinsic blood coagulation induced by bacterial endotoxin." The Journal of surgical research **87**(2): 252-257.
- Cirillo, P., G. Cali, et al. (2004). "Tissue factor binding of activated factor VII triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase activation." Circulation **109**(23): 2911-2916.

- Cirillo, P., P. Golino, et al. (2005). "C-reactive protein induces tissue factor expression and promotes smooth muscle and endothelial cell proliferation." Cardiovascular research **68**(1): 47-55.
- Combs, M. D. and K. E. Yutzey (2009). "Heart valve development: regulatory networks in development and disease." Circ Res **105**(5): 408-421.
- Conery, A. R., Y. Cao, et al. (2004). "Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis." Nat Cell Biol **6**(4): 366-372.
- Conkling, P. R., C. S. Greenberg, et al. (1988). "Tumor necrosis factor induces tissue factor-like activity in human leukemia cell line U937 and peripheral blood monocytes." Blood **72**(1): 128-133.
- Contrino, J., S. Goralnick, et al. (1997). "Fibrin induction of tissue factor expression in human vascular endothelial cells." Circulation **96**(2): 605-613.
- Cote, N., D. El Husseini, et al. (2012). "ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve." J Mol Cell Cardiol **52**(5): 1191-1202.
- Cowell, S. J., D. E. Newby, et al. (2005). "A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis." The New England journal of medicine **352**(23): 2389-2397.
- Cuchiara, M. L., S. Coskun, et al. (2015). "Bioactive poly(ethylene glycol) hydrogels to recapitulate the HSC niche and facilitate HSC expansion in culture." Biotechnol Bioeng.
- Cui, M. Z., G. C. Parry, et al. (1996). "Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated by Sp1 and EGR-1." J Biol Chem **271**(5): 2731-2739.
- Cunningham, M. A., P. Romas, et al. (1999). "Tissue factor and factor VIIa receptor/ligand interactions induce proinflammatory effects in macrophages." Blood **94**(10): 3413-3420.
- Danielsen, R., T. Aspelund, et al. (2014). "The prevalence of aortic stenosis in the elderly in Iceland and predictions for the coming decades: the AGES-Reykjavik study." Int J Cardiol **176**(3): 916-922.
- Daubie, V., S. Cauwenberghs, et al. (2006). "Factor Xa and thrombin evoke additive calcium and proinflammatory responses in endothelial cells subjected to coagulation." Biochimica et biophysica acta **1763**(8): 860-869.
- Daubie, V., R. Pochet, et al. (2007). "Tissue factor: a mini-review." J Tissue Eng Regen Med **1**(3): 161-169.
- Desmouliere, A. (1995). "Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis." Cell biology international **19**(5): 471-476.
- Desmouliere, A. and G. Gabbiani (1995). "Myofibroblast differentiation during fibrosis." Experimental nephrology **3**(2): 134-139.
- Distler, J. H., A. Jungel, et al. (2005). "The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2892-2897.

- Drake, T. A., J. H. Morrissey, et al. (1989). "Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis." Am J Pathol **134**(5): 1087-1097.
- Dreyfus, G. D., R. P. Martin, et al. (2015). "Functional tricuspid regurgitation: a need to revise our understanding." Journal of the American College of Cardiology **65**(21): 2331-2336.
- Dvorak, H. F. (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." The New England journal of medicine **315**(26): 1650-1659.
- Dweck, M. R., N. A. Boon, et al. (2012). "Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium." J Am Coll Cardiol **60**(19): 1854-1863.
- Edep, M. E., J. Shirani, et al. (2000). "Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis." Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology **9**(5): 281-286.
- Eilertsen, K. E. and B. Osterud (2004). "Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology." Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis **15**(7): 521-538.
- El-Hamamsy, I., K. Balachandran, et al. (2009). "Endothelium-dependent regulation of the mechanical properties of aortic valve cusps." Journal of the American College of Cardiology **53**(16): 1448-1455.
- Ernofsson, M., T. Tenno, et al. (1996). "Inhibition of tissue factor surface expression in human peripheral blood monocytes exposed to cytokines." British journal of haematology **95**(2): 249-257.
- Eto, M., A. Kouroedov, et al. (2005). "Glycogen synthase kinase-3 mediates endothelial cell activation by tumor necrosis factor-alpha." Circulation **112**(9): 1316-1322.
- Farivar, R. S., L. H. Cohn, et al. (2003). "Transcriptional profiling and growth kinetics of endothelium reveals differences between cells derived from porcine aorta versus aortic valve." Eur J Cardiothorac Surg **24**(4): 527-534.
- Feldman, B. J., B. K. Khandheria, et al. (1990). "Incidence, description and functional assessment of isolated quadricuspid aortic valves." Am J Cardiol **65**(13): 937-938.
- Fiore, M. M., P. F. Neuenschwander, et al. (1994). "The biochemical basis for the apparent defect of soluble mutant tissue factor in enhancing the proteolytic activities of factor VIIa." J Biol Chem **269**(1): 143-149.
- Fondard, O., D. Detaint, et al. (2005). "Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors." European heart journal **26**(13): 1333-1341.
- Fridlyanskaya, I., L. Alekseenko, et al. (2015). "Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review." Experimental gerontology **72**: 124-128.
- Garg, V., A. N. Muth, et al. (2005). "Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease." Nature **437**(7056): 270-274.
- Ghaisas, N. K., J. B. Foley, et al. (2000). "Adhesion molecules in nonrheumatic aortic valve disease: endothelial expression, serum levels and effects of valve replacement." Journal of the American College of Cardiology **36**(7): 2257-2262.

- Giesen, P. L., U. Rauch, et al. (1999). "Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2311-2315.
- Ginghina, C., A. Florian, et al. (2009). "Calcific aortic valve disease and aortic atherosclerosis--two faces of the same disease?" Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne **47**(4): 319-329.
- Girinath, M. R., J. B. Gavin, et al. (1974). "The effects of antibiotics and storage on the viability and ultrastructure of fibroblasts in canine heart valves prepared for grafting." The Australian and New Zealand journal of surgery **44**(2): 170-172.
- Gittenberger-de Groot, A. C., M. M. Bartelings, et al. (2005). "Basics of cardiac development for the understanding of congenital heart malformations." Pediatr Res **57**(2): 169-176.
- Gonzalez, D. M. and D. Medici (2014). "Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition." Science signaling **7**(344): re8.
- Gossl, M., S. Khosla, et al. (2012). "Role of circulating osteogenic progenitor cells in calcific aortic stenosis." Journal of the American College of Cardiology **60**(19): 1945-1953.
- Gould, S. T., S. Srigunapalan, et al. (2013). "Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease." Circ Res **113**(2): 186-197.
- Grande-Allen, K. J., N. Osman, et al. (2007). "Glycosaminoglycan synthesis and structure as targets for the prevention of calcific aortic valve disease." Cardiovasc Res **76**(1): 19-28.
- Grau, J. B., P. Poggio, R. Sainger, W. J. Vernick, W. F. Seefried, E. Branchetti, B. C. Field, J. E. Bavaria, M. A. Acker and G. Ferrari (2012). "Analysis of osteopontin levels for the identification of asymptomatic patients with calcific aortic valve disease." Ann Thorac Surg **93**(1): 79-86.
- Grotendorst, G. R. and M. R. Duncan (2005). "Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **19**(7): 729-738.
- Guha, M., M. A. O'Connell, et al. (2001). "Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression." Blood **98**(5): 1429-1439.
- Hajdu, Z., S. J. Romeo, et al. (2011). "Recruitment of bone marrow-derived valve interstitial cells is a normal homeostatic process." J Mol Cell Cardiol **51**(6): 955-965.
- Hakuno, D., N. Kimura, et al. (2010). "Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents." J Clin Invest **120**(7): 2292-2306.
- Han, L. and A. I. Gotlieb (2012). "Fibroblast growth factor-2 promotes in vitro heart valve interstitial cell repair through the Akt1 pathway." Cardiovasc Pathol **21**(5): 382-389.
- Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." N Engl J Med **352**(16): 1685-1695.
- Harlos, K., D. M. Martin, et al. (1994). "Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor." Nature **370**(6491): 662-666.

- Hathcock, J. J., E. Rusinova, et al. (2006). "Phospholipid surfaces regulate the delivery of substrate to tissue factor:VIIa and the removal of product." Blood cells, molecules & diseases **36**(2): 194-198.
- Helske, S., M. Kupari, et al. (2007). "Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process." Current opinion in lipidology **18**(5): 483-491.
- Helske, S., M. Laine, et al. (2007). "Increased expression of profibrotic neutral endopeptidase and bradykinin type 1 receptors in stenotic aortic valves." European heart journal **28**(15): 1894-1903.
- Helske, S., K. A. Lindstedt, et al. (2004). "Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves." Journal of the American College of Cardiology **44**(9): 1859-1866.
- Hembrough, T. A., G. M. Swartz, et al. (2003). "Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism." Cancer research **63**(11): 2997-3000.
- Henriksson, C. E., O. Klingenberg, et al. (2007). "Calcium ionophore-induced de-encryption of tissue factor in monocytes is associated with extensive cell death." Thrombosis research **119**(5): 621-630.
- Herbert, J. M., P. Savi, et al. (1992). "IL-4 inhibits LPS-, IL-1 beta- and TNF alpha-induced expression of tissue factor in endothelial cells and monocytes." FEBS Lett **310**(1): 31-33.
- Heuberger, J. and W. Birchmeier (2010). "Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(2): a002915.
- Higgins, C. L., S. A. Marvel, et al. (2005). "Quantification of calcification in atherosclerotic lesions." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **25**(8): 1567-1576.
- Hinton, R. B., J. Adelman-Brown, et al. (2010). "Elastin haploinsufficiency results in progressive aortic valve malformation and latent valve disease in a mouse model." Circulation research **107**(4): 549-557.
- Hinton, R. B., Jr., J. Lincoln, et al. (2006). "Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves." Circ Res **98**(11): 1431-1438.
- Hinton, R. B. and K. E. Yutzey (2011). "Heart valve structure and function in development and disease." Annual review of physiology **73**: 29-46.
- Hinz, B., P. Pittet, et al. (2004). "Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions." Molecular biology of the cell **15**(9): 4310-4320.
- Hjortoe, G. M., L. C. Petersen, et al. (2004). "Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration." Blood **103**(8): 3029-3037.
- Hogg, P. J. (2009). "Contribution of allosteric disulfide bonds to regulation of hemostasis." J Thromb Haemost **7 Suppl 1**: 13-16.
- Holme, I., K. Boman, et al. (2010). "Observed and predicted reduction of ischemic cardiovascular events in the Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis trial." The American journal of cardiology **105**(12): 1802-1808.

- Houston, P., M. C. Dickson, et al. (1999). "Fluid shear stress induction of the tissue factor promoter in vitro and in vivo is mediated by Egr-1." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(2): 281-289.
- Huang, M., R. Syed, et al. (1998). "The mechanism of an inhibitory antibody on TF-initiated blood coagulation revealed by the crystal structures of human tissue factor, Fab 5G9 and TF.G9 complex." Journal of molecular biology **275**(5): 873-894.
- Huang, R. Y., P. Guilford, et al. (2012). "Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition." Journal of cell science **125**(Pt 19): 4417-4422.
- Hutcheson, J. D., J. Chen, et al. (2013). "Cadherin-11 regulates cell-cell tension necessary for calcific nodule formation by valvular myofibroblasts." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(1): 114-120.
- Ignatowicz, E. and W. Baer-Dubowska (2001). "Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases." Polish journal of pharmacology **53**(6): 557-569.
- Imamura, T., H. Kaneda, et al. (2002). "New functions of neutrophils in the arthus reaction: expression of tissue factor, the clotting initiator, and fibrinolysis by elastase." Lab Invest **82**(10): 1287-1295.
- Ito, T. (2014). "PAMPs and DAMPs as triggers for DIC." Journal of intensive care **2**(1): 67.
- Ix, J. H., G. M. Chertow, et al. (2007). "Association of fetuin-A with mitral annular calcification and aortic stenosis among persons with coronary heart disease: data from the Heart and Soul Study." Circulation **115**(19): 2533-2539.
- Jeanpierre, E., T. Le Tourneau, et al. (2003). "Dietary lipid lowering modifies plaque phenotype in rabbit atheroma after angioplasty: a potential role of tissue factor." Circulation **108**(14): 1740-1745.
- Jeanpierre, E., T. Le Tourneau, et al. (2009). "Beneficial effects of fenofibrate on plaque thrombogenicity and plaque stability in atherosclerotic rabbits." Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology **18**(3): 140-147.
- Jenkins, R. G., X. Su, et al. (2006). "Ligation of protease-activated receptor 1 enhances alpha(v)beta6 integrin-dependent TGF-beta activation and promotes acute lung injury." The Journal of clinical investigation **116**(6): 1606-1614.
- Jian, B., P. L. Jones, et al. (2001). "Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis." The American journal of pathology **159**(1): 321-327.
- Jian, B., N. Narula, et al. (2003). "Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis." Ann Thorac Surg **75**(2): 457-465; discussion 465-456.
- Jian, B., J. Xu, et al. (2002). "Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor-beta1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells." Am J Pathol **161**(6): 2111-2121.
- Jiang, R., N. P. Wang, et al. (2011). "Factor Xa induces tissue factor expression in endothelial cells by P44/42 MAPK and NF-kappaB-dependent pathways." The Journal of surgical research **169**(2): 319-327.

- Johnson, C. M., M. N. Hanson, et al. (1987). "Porcine cardiac valvular subendothelial cells in culture: cell isolation and growth characteristics." Journal of molecular and cellular cardiology **19**(12): 1185-1193.
- Kaden, J. J., S. Bickelhaupt, et al. (2004). "Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification." J Mol Cell Cardiol **36**(1): 57-66.
- Kaden, J. J., C. E. Dempfle, et al. (2003). "Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis." Atherosclerosis **170**(2): 205-211.
- Kamimura, M., C. Viedt, et al. (2005). "Interleukin-10 suppresses tissue factor expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages via inhibition of Egr-1 and a serum response element/MEK-ERK1/2 pathway." Circulation research **97**(4): 305-313.
- Kamstrup, P. R., A. Tybjaerg-Hansen, et al. (2014). "Elevated lipoprotein(a) and risk of aortic valve stenosis in the general population." Journal of the American College of Cardiology **63**(5): 470-477.
- Kelley, R. F., K. E. Costas, et al. (1995). "Analysis of the factor VIIa binding site on human tissue factor: effects of tissue factor mutations on the kinetics and thermodynamics of binding." Biochemistry **34**(33): 10383-10392.
- Kelley, R. F., J. Yang, et al. (2004). "Similar molecular interactions of factor VII and factor VIIa with the tissue factor region that allosterically regulates enzyme activity." Biochemistry **43**(5): 1223-1229.
- Khan, A. R. and M. N. James (1998). "Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes." Protein science : a publication of the Protein Society **7**(4): 815-836.
- Khrenov, A. V., N. M. Ananyeva, et al. (2002). "Coagulation pathways in atherothrombosis." Trends Cardiovasc Med **12**(7): 317-324.
- Kirchhofer, D., M. T. Lipari, et al. (2000). "The tissue factor region that interacts with substrates factor IX and Factor X." Biochemistry **39**(25): 7380-7387.
- Kochtebane, N., A. M. Alzahrani, et al. (2014). "Expression of uPA, tPA, and PAI-1 in Calcified Aortic Valves." Biochem Res Int **2014**: 658643.
- Kochtebane, N., C. Choqueux, et al. (2012). "[Aortic stenosis and extracellular matrix remodeling]." Biol Aujourdhui **206**(2): 135-143.
- Kochtebane, N., C. Choqueux, et al. (2010). "Plasmin induces apoptosis of aortic valvular myofibroblasts." J Pathol **221**(1): 37-48.
- Konduri, S., Y. Xing, et al. (2005). "Normal physiological conditions maintain the biological characteristics of porcine aortic heart valves: an ex vivo organ culture study." Ann Biomed Eng **33**(9): 1158-1166.
- Kothari, H., R. C. Nayak, et al. (2010). "Cystine 186-cystine 209 disulfide bond is not essential for the procoagulant activity of tissue factor or for its de-encryption." Blood **115**(21): 4273-4283.
- Koumas, L., T. J. Smith, et al. (2003). "Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes." Am J Pathol **163**(4): 1291-1300.

- Kratchmarova, I., B. Blagoev, et al. (2005). "Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation." Science **308**(5727): 1472-1477.
- Khrenov, A. V., N. M. Ananyeva, J. H. Griffin and E. L. Saenko (2002). "Coagulation pathways in atherothrombosis." Trends Cardiovasc Med **12**(7): 317-324.
- Krudysz-Amblo, J., M. E. Jennings, 2nd, et al. (2010). "Carbohydrates and activity of natural and recombinant tissue factor." J Biol Chem **285**(5): 3371-3382.
- Kushak, R. I., E. Nestoridi, et al. (2005). "Detached endothelial cells and microparticles as sources of tissue factor activity." Thromb Res **116**(5): 409-419.
- Lamouille, S., J. Xu, et al. (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." Nature reviews. Molecular cell biology **15**(3): 178-196.
- Lan, H. Y. and A. C. Chung (2012). "TGF-beta/Smad signaling in kidney disease." Seminars in nephrology **32**(3): 236-243.
- Latif, N., P. Sarathchandra, et al. (2005). "Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves." The Journal of heart valve disease **14**(2): 218-227.
- Lawson, C. A., S. D. Yan, et al. (1997). "Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation." The Journal of clinical investigation **99**(7): 1729-1738.
- Leskela, H. V., J. Satta, et al. (2006). "Calcification and cellularity in human aortic heart valve tissue determine the differentiation of bone-marrow-derived cells." J Mol Cell Cardiol **41**(4): 642-649.
- Levine, R. A., A. A. Hagege, et al. (2015). "Mitral valve disease-morphology and mechanisms." Nature reviews. Cardiology **12**(12): 689-710.
- Li, C., M. E. Collier, et al. (2008). "Investigation of the mechanisms of tissue factor-mediated evasion of tumour cells from cellular cytotoxicity." Cancer immunology, immunotherapy : CII **57**(9): 1347-1355.
- Li, C., S. Xu, et al. (2013). "The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops." Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology **22**(1): 1-8.
- Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-874.
- Liesmaa, I., H. K. Leskinen, et al. (2009). "Hypoxia-induced expression of bradykinin type-2 receptors in endothelial cells triggers NO production, cell migration, and angiogenesis." Journal of cellular physiology **221**(2): 359-366.
- Lijnen, H. R. (2001). "Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling." Thromb Haemost **86**(1): 324-333.
- Lincoln, J., R. Kist, et al. (2007). "Sox9 is required for precursor cell expansion and extracellular matrix organization during mouse heart valve development." Dev Biol **305**(1): 120-132.
- Lind, T., A. Sundqvist, L. Hu, G. Pejler, G. Andersson, A. Jacobson and H. Melhus (2013). "Vitamin a is a negative regulator of osteoblast mineralization." PLoS One **8**(12): e82388.

- Liu, A. C., V. R. Joag, et al. (2007). "The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology." The American journal of pathology **171**(5): 1407-1418.
- Liu, Y., K. Pelekanakis, et al. (2004). "Thrombin and tumor necrosis factor alpha synergistically stimulate tissue factor expression in human endothelial cells: regulation through c-Fos and c-Jun." The Journal of biological chemistry **279**(34): 36142-36147.
- Lopez-Pedreira, C., N. Barbarroja, et al. (2006). "Tissue factor as an effector of angiogenesis and tumor progression in hematological malignancies." Leukemia **20**(8): 1331-1340.
- Ludwig, T. E., M. E. Levenstein, J. M. Jones, W. T. Berggren, E. R. Mitchen, J. L. Frane, L. J. Crandall, C. A. Daigh, K. R. Conard, M. S. Piekarczyk, R. A. Llanas and J. A. Thomson (2006). "Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions." Nat Biotechnol **24**(2): 185-187.
- Luna-Zurita, L., B. Prados, et al. (2010). "Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation." J Clin Invest **120**(10): 3493-3507.
- Mabry, K. M., R. L. Lawrence, et al. (2015). "Dynamic stiffening of poly(ethylene glycol)-based hydrogels to direct valvular interstitial cell phenotype in a three-dimensional environment." Biomaterials **49**: 47-56.
- Mabry, K. M., S. Z. Payne, et al. (2015). "Microarray analyses to quantify advantages of 2D and 3D hydrogel culture systems in maintaining the native valvular interstitial cell phenotype." Biomaterials **74**: 31-41.
- Mackman, N. (1997). "Regulation of the tissue factor gene." Thromb Haemost **78**(1): 747-754.
- Mackman, N., K. Brand, et al. (1991). "Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites." J Exp Med **174**(6): 1517-1526.
- Macri-Pellizzeri, L., B. Pelacho, A. Sancho, O. Iglesias-Garcia, A. M. Simon-Yarza, M. Soriano-Navarro, S. Gonzalez-Granero, J. M. Garcia-Verdugo, E. M. De-Juan-Pardo and F. Prosper (2015). "Substrate stiffness and composition specifically direct differentiation of induced pluripotent stem cells." Tissue Eng Part A **21**(9-10): 1633-1641.
- Mahler, G. J. and J. T. Butcher (2011). "Inflammatory regulation of valvular remodeling: the good(?), the bad, and the ugly." Int J Inflamm **2011**: 721419.
- Mahler, G. J., E. J. Farrar, et al. (2013). "Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **33**(1): 121-130.
- Mahmut, A., M. C. Boulanger, et al. (2014). "Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in calcific aortic valve disease: implications for valve mineralization." J Am Coll Cardiol **63**(5): 460-469.
- Malfait, F., S. Symoens, et al. (2006). "Total absence of the alpha2(I) chain of collagen type I causes a rare form of Ehlers-Danlos syndrome with hypermobility and propensity to cardiac valvular problems." J Med Genet **43**(7): e36.

- Marechaux, S., D. Corseaux, et al. (2009). "Identification of tissue factor in experimental aortic valve sclerosis." Cardiovasc Pathol **18**(2): 67-76.
- Masters, K. S., D. N. Shah, et al. (2004). "Designing scaffolds for valvular interstitial cells: cell adhesion and function on naturally derived materials." J Biomed Mater Res A **71**(1): 172-180.
- Mathieu, P. (2012). "Pharmacology of ectonucleotidases: relevance for the treatment of cardiovascular disorders." Eur J Pharmacol **696**(1-3): 1-4.
- Mathieu, P. and M. C. Boulanger (2014). "Basic mechanisms of calcific aortic valve disease." Can J Cardiol **30**(9): 982-993.
- Mazzone, A., M. C. Epistolato, et al. (2004). "Neoangiogenesis, T-lymphocyte infiltration, and heat shock protein-60 are biological hallmarks of an immunomediated inflammatory process in end-stage calcified aortic valve stenosis." J Am Coll Cardiol **43**(9): 1670-1676.
- McVey, J. H. (1994). "Tissue factor pathway." Baillieres Clin Haematol **7**(3): 469-484.
- Mechiche, H., P. Cornillet-Lefebvre, et al. (2005). "A subpopulation of human B lymphocytes can express a functional Tissue Factor in response to phorbol myristate acetate." Thromb Haemost **94**(1): 146-154.
- Mechtcheriakova, D., A. Wlachos, et al. (1999). "Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1." Blood **93**(11): 3811-3823.
- Miller, J. D., R. M. Weiss, et al. (2011). "Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms." Circulation research **108**(11): 1392-1412.
- Misfeld, M. and H. H. Sievers (2007). "Heart valve macro- and microstructure." Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences **362**(1484): 1421-1436.
- Mohler, E. R., 3rd, M. K. Chawla, et al. (1999). "Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves." The Journal of heart valve disease **8**(3): 254-260.
- Monroe, D. M. and N. S. Key (2007). "The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking." J Thromb Haemost **5**(6): 1097-1105.
- Mookadam, F., V. R. Thota, et al. (2010). "Unicuspid aortic valve in adults: a systematic review." J Heart Valve Dis **19**(1): 79-85.
- Moore, K. J. and I. Tabas (2011). "Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis." Cell **145**(3): 341-355.
- Moosbauer, C., E. Morgenstern, et al. (2007). "Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure." Blood **109**(3): 995-1002.
- Morel, O., F. Toti, et al. (2006). "Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(12): 2594-2604.
- Morrissey, J. H., H. Fakhrai, et al. (1987). "Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade." Cell **50**(1): 129-135.

- Morrissey, J. H., P. F. Neuenschwander, et al. (1997). "Factor VIIa-tissue factor: functional importance of protein-membrane interactions." Thromb Haemost **78**(1): 112-116.
- Morrissey, J. H., V. Pureza, et al. (2008). "Blood clotting reactions on nanoscale phospholipid bilayers." Thrombosis research **122 Suppl 1**: S23-26.
- Moura, L. M., S. F. Ramos, et al. (2007). "Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis." Journal of the American College of Cardiology **49**(5): 554-561.
- Muller, Y. A., M. H. Ultsch, et al. (1996). "The crystal structure of the extracellular domain of human tissue factor refined to 1.7 Å resolution." J Mol Biol **256**(1): 144-159.
- Munt, B., M. E. Legget, et al. (1999). "Physical examination in valvular aortic stenosis: correlation with stenosis severity and prediction of clinical outcome." American heart journal **137**(2): 298-306.
- Muth, H., I. Kreis, et al. (2005). "Differential gene expression in activated monocyte-derived macrophages following binding of factor VIIa to tissue factor." Thrombosis and haemostasis **94**(5): 1028-1034.
- Natorska, J., G. Marek, et al. (2011). "Fibrin presence within aortic valves in patients with aortic stenosis: association with in vivo thrombin generation and fibrin clot properties." Thromb Haemost **105**(2): 254-260.
- Natorska, J., G. Marek, et al. (2009). "Evidence for tissue factor expression in aortic valves in patients with aortic stenosis." Pol Arch Med Wewn **119**(10): 636-643.
- Neumann, F. J., I. Ott, et al. (1997). "Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(12): 3399-3405.
- Ngo, D. T., A. L. Sverdlov, et al. (2012). "Prevention of aortic valve stenosis: a realistic therapeutic target?" Pharmacology & therapeutics **135**(1): 78-93.
- Nightingale, A. K. and J. D. Horowitz (2005). "Aortic sclerosis: not an innocent murmur but a marker of increased cardiovascular risk." Heart **91**(11): 1389-1393.
- Norris, L. A., S. Weldon, et al. (2006). "LPS induced tissue factor expression in the THP-1 monocyte cell line is attenuated by conjugated linoleic acid." Thrombosis research **117**(4): 475-480.
- Novaro, G. M., I. Y. Tiong, et al. (2001). "Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis." Circulation **104**(18): 2205-2209.
- O'Brien, D. P. (1989). "The molecular biology and biochemistry of tissue factor." Baillieres Clin Haematol **2**(4): 801-820.
- O'Brien, K. D., D. M. Shavelle, et al. (2002). "Association of angiotensin-converting enzyme with low-density lipoprotein in aortic valvular lesions and in human plasma." Circulation **106**(17): 2224-2230.
- Oeth, P., G. C. Parry, et al. (1997). "Regulation of the tissue factor gene in human monocytic cells. Role of AP-1, NF-kappa B/Rel, and Sp1 proteins in uninduced and lipopolysaccharide-induced expression." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(2): 365-374.

- Ollivier, V., J. Chabbat, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts in response to factor VIIa binding to tissue factor involves thrombin and factor Xa." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **20**(5): 1374-1381.
- Olson, E. N. (2004). "A decade of discoveries in cardiac biology." Nat Med **10**(5): 467-474.
- Olsson, M., J. Thyberg, et al. (1999). "Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **19**(5): 1218-1222.
- Osman, L., M. H. Yacoub, et al. (2006). "Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin." Circulation **114**(1 Suppl): I547-552.
- Osnes, L. T., K. B. Foss, et al. (1996). "Acetylsalicylic acid and sodium salicylate inhibit LPS-induced NF-kappa B/c-Rel nuclear translocation, and synthesis of tissue factor (TF) and tumor necrosis factor alfa (TNF-alpha) in human monocytes." Thromb Haemost **76**(6): 970-976.
- Osovsokaya, V. S. and N. W. Bunnett (2004). "Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease." Physiol Rev **84**(2): 579-621.
- Osterud, B., J. O. Olsen, et al. (1984). "The role of complement in the induction of thromboplastin synthesis." Haemostasis **14**(5): 386-392.
- Ott, I., B. Weigand, et al. (2005). "Tissue factor cytoplasmic domain stimulates migration by activation of the GTPase Rac1 and the mitogen-activated protein kinase p38." Circulation **111**(3): 349-355.
- Otto, C. M. (2015). "Almanac 2014: aortic valve disease." Heart **101**(12): 929-935.
- Otto, C. M., I. G. Burwash, et al. (1997). "Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome." Circulation **95**(9): 2262-2270.
- Otto, C. M., J. Kuusisto, et al. (1994). "Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies." Circulation **90**(2): 844-853.
- Otto, C. M., B. K. Lind, et al. (1999). "Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly." The New England journal of medicine **341**(3): 142-147.
- Paborsky, L. R., B. M. Fendly, et al. (1990). "Mammalian cell transient expression of tissue factor for the production of antigen." Protein Eng **3**(6): 547-553.
- Parisi, V., D. Leosco, et al. (2015). "The lipid theory in the pathogenesis of calcific aortic stenosis." Nutr Metab Cardiovasc Dis **25**(6): 519-525.
- Pate, G. E. (2002). "Association between aortic stenosis and hypertension." The Journal of heart valve disease **11**(5): 612-614.
- Payvandi, L. A. and V. H. Rigolin (2013). "Calcific mitral stenosis." Cardiology clinics **31**(2): 193-202
- Pena-Silva, R. A., J. D. Miller, et al. (2009). "Serotonin produces monoamine oxidase-dependent oxidative stress in human heart valves." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(4): H1354-1360.

- Perrotta, I., E. Russo, et al. (2011). "New evidence for a critical role of elastin in calcification of native heart valves: immunohistochemical and ultrastructural study with literature review." Histopathology **59**(3): 504-513.
- Person, A. D., S. E. Klewer, et al. (2005). "Cell biology of cardiac cushion development." International review of cytology **243**: 287-335.
- Pho, M., W. Lee, et al. (2008). "Cofilin is a marker of myofibroblast differentiation in cells from porcine aortic cardiac valves." Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**(4): H1767-1778.
- Pibarot, P. and J. G. Dumesnil (2007). "New concepts in valvular hemodynamics: implications for diagnosis and treatment of aortic stenosis." The Canadian journal of cardiology **23 Suppl B**: 40B-47B.
- Pohle, K., R. Maffert, et al. (2001). "Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors." Circulation **104**(16): 1927-1932.
- Poitevin, S., E. Cochery-Nouvellon, et al. (2007). "Monocyte IL-10 produced in response to lipopolysaccharide modulates thrombin generation by inhibiting tissue factor expression and release of active tissue factor-bound microparticles." Thrombosis and haemostasis **97**(4): 598-607.
- Poulsen, L. K., N. Jacobsen, et al. (1998). "Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor." The Journal of biological chemistry **273**(11): 6228-6232.
- Proudfoot, D., J. N. Skepper, et al. (2000). "Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies." Circ Res **87**(11): 1055-1062.
- Puhlmann, M., D. M. Weinreich, et al. (2005). "Interleukin-1beta induced vascular permeability is dependent on induction of endothelial tissue factor (TF) activity." Journal of translational medicine **3**: 37.
- Pyeritz, R. E. (2000). "The Marfan syndrome." Annual review of medicine **51**: 481-510.
- Quinlan, A. M. and K. L. Billiar (2012). "Investigating the role of substrate stiffness in the persistence of valvular interstitial cell activation." Journal of biomedical materials research. Part A **100**(9): 2474-2482.
- Rabkin-Aikawa, E., M. Farber, et al. (2004). "Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves." The Journal of heart valve disease **13**(5): 841-847.
- Rajamannan, N. M. and C. M. Otto (2004). "Targeted therapy to prevent progression of calcific aortic stenosis." Circulation **110**(10): 1180-1182.
- Rajamannan, N. M., M. Subramaniam, et al. (2005). "Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced calcification in the aortic valves via the Lrp5 receptor pathway." Circulation **112**(9 Suppl): I229-234.
- Rajamannan, N. M., M. Subramaniam, et al. (2003). "Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype." Circulation **107**(17): 2181-2184.

- Rehemtulla, A., W. Ruf, et al. (1991). "The integrity of the cysteine 186-cysteine 209 bond of the second disulfide loop of tissue factor is required for binding of factor VII." J Biol Chem **266**(16): 10294-10299.
- Rekhter, M. D. and D. Gordon (1995). "Active proliferation of different cell types, including lymphocytes, in human atherosclerotic plaques." The American journal of pathology **147**(3): 668-677.
- Ren, Z., L. Wang, et al. (2013). "Resveratrol inhibits NF-kB signaling through suppression of p65 and I $\kappa$ B kinase activities." Die Pharmazie **68**(8): 689-694.
- Riewald, M., V. V. Kravchenko, et al. (2001). "Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1." Blood **97**(10): 3109-3116.
- Rigby, M. L. (2012). "Severe aortic or pulmonary valve stenosis in premature infants." Early human development **88**(5): 291-294.
- Roberts, H. R., D. M. Monroe, et al. (2004). "Current concepts of hemostasis: implications for therapy." Anesthesiology **100**(3): 722-730.
- Roberts, W. C. and J. M. Ko (2005). "Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation." Circulation **111**(7): 920-925.
- Rodriguez, K. J. and K. S. Masters (2009). "Regulation of valvular interstitial cell calcification by components of the extracellular matrix." J Biomed Mater Res A **90**(4): 1043-1053.
- Roosens, B., S. Droogmans, et al. (2011). "Integrated backscatter for the in vivo quantification of supraphysiological vitamin D(3)-induced cardiovascular calcifications in rats." Cardiovascular toxicology **11**(3): 244-252.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.
- Roth, R. I. (1994). "Hemoglobin enhances the production of tissue factor by endothelial cells in response to bacterial endotoxin." Blood **83**(10): 2860-2865.
- Rothenburger, M., W. Volker, et al. (2002). "Tissue engineering of heart valves: formation of a three-dimensional tissue using porcine heart valve cells." ASAIO journal **48**(6): 586-591.
- Royce, S. G., V. Cheng, et al. (2012). "The regulation of fibrosis in airway remodeling in asthma." Molecular and cellular endocrinology **351**(2): 167-175.
- Ruf, W., A. Rehemtulla, et al. (1991). "Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function." J Biol Chem **266**(4): 2158-2166.
- Ruf, W., J. R. Schullek, et al. (1994). "Mutational mapping of functional residues in tissue factor: identification of factor VII recognition determinants in both structural modules of the predicted cytokine receptor homology domain." Biochemistry **33**(6): 1565-1572.
- Rush, M. N., K. E. Coombs, et al. (2015). "Surface chemistry regulates valvular interstitial cell differentiation in vitro." Acta biomaterialia **28**: 76-85.

- Ryden, L., D. Grabau, et al. (2010). "Evidence for tissue factor phosphorylation and its correlation with protease-activated receptor expression and the prognosis of primary breast cancer." International journal of cancer. Journal international du cancer **126**(10): 2330-2340.
- Sacks, M. S., W. David Merryman, et al. (2009). "On the biomechanics of heart valve function." Journal of biomechanics **42**(12): 1804-1824.
- Samarakoon, R. and P. J. Higgins (2008). "Integration of non-SMAD and SMAD signaling in TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression in vascular smooth muscle cells." Thrombosis and haemostasis **100**(6): 976-983.
- Sanigorski, A. J., K. O'Dea, et al. (1994). "n-3 fatty acids reduce in vitro thromboxane production while having little effect on in vitro prostacyclin production in the rat." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids **50**(5): 223-228.
- Sato, Y., Y. Asada, et al. (1996). "Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells." Thrombosis and haemostasis **75**(3): 389-392.
- Satta, J., J. Melkko, et al. (2002). "Progression of human aortic valve stenosis is associated with tenascin-C expression." Journal of the American College of Cardiology **39**(1): 96-101.
- Satta, J., J. Oiva, et al. (2003). "Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis." The Annals of thoracic surgery **76**(3): 681-688; discussion 688.
- Schoen, F. J. (2008). "Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering." Circulation **118**(18): 1864-1880.
- Schoen, F. J. and R. J. Levy (1999). "Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives." J Biomed Mater Res **47**(4): 439-465.
- Schurgers, L. J., E. C. Cranenburg, et al. (2008). "Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K." Thrombosis and haemostasis **100**(4): 593-603.
- Sen, M., M. Herzik, et al. (2009). "Spectroscopic Characterization of Successive Phosphorylation of the Tissue Factor Cytoplasmic Region." Open Spectrosc J **3**: 58-64.
- Shelton, E. L. and K. E. Yutzey (2008). "Twist1 function in endocardial cushion cell proliferation, migration, and differentiation during heart valve development." Dev Biol **317**(1): 282-295.
- Shuvy, M., S. Abedat, et al. (2008). "Uraemic hyperparathyroidism causes a reversible inflammatory process of aortic valve calcification in rats." Cardiovascular research **79**(3): 492-499.
- Siddiqui, F. A., H. Desai, et al. (2002). "The presence and release of tissue factor from human platelets." Platelets **13**(4): 247-253.
- Siegbahn, A., M. Johnell, et al. (2000). "Binding of factor VIIa to tissue factor on human fibroblasts leads to activation of phospholipase C and enhanced PDGF-BB-stimulated chemotaxis." Blood **96**(10): 3452-3458.

- Sievers, H. H. and C. Schmidtke (2007). "A classification system for the bicuspid aortic valve from 304 surgical specimens." J Thorac Cardiovasc Surg **133**(5): 1226-1233.
- Simmons, C. A., G. R. Grant, et al. (2005). "Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves." Circulation research **96**(7): 792-799.
- Smith, E. B., G. A. Keen, et al. (1990). "Fate of fibrinogen in human arterial intima." Arteriosclerosis **10**(2): 263-275.
- Snider, P., R. B. Hinton, et al. (2008). "Periostin is required for maturation and extracellular matrix stabilization of noncardiomyocyte lineages of the heart." Circ Res **102**(7): 752-760.
- Soini, Y., T. Salo, et al. (2003). "Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis." Human pathology **34**(8): 756-763.
- Song, W., K. Jackson, et al. (2000). "Degradation of type IV collagen by matrix metalloproteinases is an important step in the epithelial-mesenchymal transformation of the endocardial cushions." Dev Biol **227**(2): 606-617.
- Sorensen, B. B., L. V. Rao, et al. (2003). "Antiapoptotic effect of coagulation factor VIIa." Blood **102**(5): 1708-1715.
- Spicer, E. K., R. Horton, et al. (1987). "Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(15): 5148-5152.
- Steffel, J., A. Akhmedov, et al. (2005). "Histamine induces tissue factor expression: implications for acute coronary syndromes." Circulation **112**(3): 341-349.
- Stein, P. D., H. N. Sabbah, et al. (1977). "Continuing disease process of calcific aortic stenosis. Role of microthrombi and turbulent flow." The American journal of cardiology **39**(2): 159-163.
- Stephens, E. H. and K. J. Grande-Allen (2007). "Age-related changes in collagen synthesis and turnover in porcine heart valves." The Journal of heart valve disease **16**(6): 672-682.
- Stewart, B. F., D. Siscovick, et al. (1997). "Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study." Journal of the American College of Cardiology **29**(3): 630-634.
- Stout, K. K. and C. M. Otto (2007). "Indications for aortic valve replacement in aortic stenosis." J Intensive Care Med **22**(1): 14-25.
- Strickberger, S. A., S. P. Schulman, et al. (1987). "Association of Paget's disease of bone with calcific aortic valve disease." Am J Med **82**(5): 953-956.
- Sturk-Mauelin, K. N., R. Nieuwland, et al. (2003). "Pro- and non-coagulant forms of non-cell-bound tissue factor in vivo." J Thromb Haemost **1**(9): 1920-1926.
- Tanaka, K., M. Sata, et al. (2005). "Age-associated aortic stenosis in apolipoprotein E-deficient mice." Journal of the American College of Cardiology **46**(1): 134-141.
- Taylor, I. W. and J. L. Wrana (2008). "SnapShot: The TGFbeta pathway interactome." Cell **133**(2): 378 e371.

- Taylor, P. M., S. P. Allen, et al. (2000). "Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin." J Heart Valve Dis **9**(1): 150-158.
- Tedgui, A. and Z. Mallat (2006). "Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways." Physiol Rev **86**(2): 515-581.
- Thaden, J. J., V. T. Nkomo, et al. (2014). "The global burden of aortic stenosis." Progress in cardiovascular diseases **56**(6): 565-571.
- Thanassoulis, G., C. Y. Campbell, et al. (2013). "Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis." N Engl J Med **368**(6): 503-512.
- Thayer, P., K. Balachandran, et al. (2011). "The effects of combined cyclic stretch and pressure on the aortic valve interstitial cell phenotype." Annals of biomedical engineering **39**(6): 1654-1667.
- Thiery, J. P. and J. P. Sleeman (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(2): 131-142.
- Timmerman, L. A., J. Grego-Bessa, et al. (2004). "Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation." Genes Dev **18**(1): 99-115.
- Timperley, J., R. Milner, et al. (2002). "Quadricuspid aortic valves." Clin Cardiol **25**(12): 548-552.
- Togashi, M., K. Tamura, et al. (2008). "Comparative study of calcified changes in aortic valvular diseases." Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi **75**(3): 138-145.
- Townsend, T. A., J. Y. Robinson, et al. (2011). "BMP-2 and TGFbeta2 shared pathways regulate endocardial cell transformation." Cells, tissues, organs **194**(1): 1-12.
- Trejo, J., A. J. Connolly, et al. (1996). "The cloned thrombin receptor is necessary and sufficient for activation of mitogen-activated protein kinase and mitogenesis in mouse lung fibroblasts. Loss of responses in fibroblasts from receptor knockout mice." The Journal of biological chemistry **271**(35): 21536-21541.
- Ueland, T., P. Aukrust, et al. (2011). "Osteoprotegerin levels predict mortality in patients with symptomatic aortic stenosis." Journal of internal medicine **270**(5): 452-460.
- Veinot, J. P. (2006). "Pathology of inflammatory native valvular heart disease." Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology **15**(5): 243-251.
- Verhoeven, M. C., C. Haase, et al. (2011). "Wnt signaling regulates atrioventricular canal formation upstream of BMP and Tbx2." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol **91**(6): 435-440.
- Versteeg, H. H., C. A. Spek, et al. (2004). "Tissue factor and cancer metastasis: the role of intracellular and extracellular signaling pathways." Molecular medicine **10**(1-6): 6-11.
- Visconti, R. P., Y. Ebihara, et al. (2006). "An in vivo analysis of hematopoietic stem cell potential: hematopoietic origin of cardiac valve interstitial cells." Circulation research **98**(5): 690-696.

- Wang, H., B. Sridhar, et al. (2013). "Characterization of cell subpopulations expressing progenitor cell markers in porcine cardiac valves." PloS one **8**(7): e69667.
- Warkentin, T. E., J. C. Moore, et al. (1992). "Aortic stenosis and bleeding gastrointestinal angiodysplasia: is acquired von Willebrand's disease the link?" Lancet **340**(8810): 35-37.
- Weber, M., M. Hausen, et al. (2006). "Prognostic value of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide for conservatively and surgically treated patients with aortic valve stenosis." Heart **92**(11): 1639-1644.
- Weiss, H. J., T. Hoffmann, et al. (1994). "Further studies on the presence of functional tissue factor activity on the subendothelium of normal human and rabbit arteries." Thromb Res **73**(5): 313-326.
- Wilcox, J. N., S. Noguchi, et al. (2003). "Extrahepatic synthesis of factor VII in human atherosclerotic vessels." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(1): 136-141.
- Wilcox, J. N., K. M. Smith, et al. (1989). "Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2839-2843.
- Wilson, W., K. A. Taubert, et al. (2007). "Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group." Circulation **116**(15): 1736-1754.
- Wolberg, A. S., D. M. Monroe, et al. (1999). "Tissue factor de-encryption: ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms." Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis **10**(4): 201-210.
- Wong, R. S., F. M. Follis, et al. (1995). "Osteogenesis imperfecta and cardiovascular diseases." Ann Thorac Surg **60**(5): 1439-1443.
- Wu, S. Q. and W. C. Aird (2005). "Thrombin, TNF-alpha, and LPS exert overlapping but nonidentical effects on gene expression in endothelial cells and vascular smooth muscle cells." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology **289**(2): H873-885.
- Wygrecka, M., G. Kwapiszewska, et al. (2011). "Role of protease-activated receptor-2 in idiopathic pulmonary fibrosis." American journal of respiratory and critical care medicine **183**(12): 1703-1714.
- Wypasek, E., J. Natorska, et al. (2013). "Mast cells in human stenotic aortic valves are associated with the severity of stenosis." Inflammation **36**(2): 449-456.
- Yilmaz, M. and G. Christofori (2009). "EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion." Cancer metastasis reviews **28**(1-2): 15-33.
- Yip, C. Y., J. H. Chen, et al. (2009). "Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(6): 936-942.

- Yip, C. Y. and C. A. Simmons (2011). "The aortic valve microenvironment and its role in calcific aortic valve disease." Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology **20**(3): 177-182.
- Yoshioka, M., S. Yuasa, et al. (2006). "Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis." Nature medicine **12**(10): 1151-1159.
- Yuan, S. M. and H. Jing (2010). "The bicuspid aortic valve and related disorders." Sao Paulo Med J **128**(5): 296-301.
- Zawadzki, C., N. Chatelain, et al. (2009). "Tissue factor pathway inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques." Atherosclerosis **204**(2): e4-14.
- Zawadzki, C., S. Susen, et al. (2007). "Dyslipidemia shifts the tissue factor/tissue factor pathway inhibitor balance toward increased thrombogenicity in atherosclerotic plaques: evidence for a corrective effect of statins." Atherosclerosis **195**(2): e117-125.
- Zeadin, M., M. Butcher, et al. (2009). "Effect of leptin on vascular calcification in apolipoprotein E-deficient mice." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **29**(12): 2069-2075.
- Zhang, J., J. Ding, et al. (2005). "Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) production and angiogenesis by tissue Factor (TF) in SGC-7901 gastric cancer cells." Cancer Biol Ther **4**(7): 769-772.
- Zhang, M., X. Liu, et al. (2014). "MicroRNA-30b is a multifunctional regulator of aortic valve interstitial cells." J Thorac Cardiovasc Surg **147**(3): 1073-1080 e1072.
- Zhang, Y., Y. Deng, et al. (1994). "Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice." The Journal of clinical investigation **94**(3): 1320-1327.

**Thèse de Doctorat de l'Université de Lille 2**  
**Anaïs ARBESU Y MIAR, le 16 décembre 2015**

---

**Cellule interstitielle de valve et sténose aortique: impact de la voie du facteur tissulaire**

Définie comme étant le rétrécissement de la valve, la sténose aortique (SA) est la 3<sup>ème</sup> pathologie cardiovasculaire dans les pays industrialisés. Touchant essentiellement les personnes âgées de plus de 65 ans, cette pathologie représente un véritable problème de santé publique compte tenu du vieillissement de la population. Considérée initialement comme issue d'un processus passif de dégénérescence, il est désormais établi que la sténose aortique est une pathologie dite « atherosclerosis-like » caractérisée par les processus d'inflammation, de fibrose, de néo-angiogenèse et de calcification. Certaines protéines de la voie de coagulation tel que le facteur tissulaire (FT) sont connues pour avoir un rôle pro-fibrotique et participent activement au développement des lésions athéroscléreuses. Leurs rôles dans la SA semblent donc probables et restent à être identifiés.

Composante cellulaire majeure de la valve aortique, les VICs présentent 5 sous-populations distinctes : les cellules progénitrices embryonnaires (EPCs), les cellules progénitrices (pVICs), quiescentes (qVICs), activées (aVICs) et ostéoblastiques (obVICs). Au cours de la valvulogenèse, les EPCs permettent la cellularisation de la valve en se différenciant en qVIC. Celles-ci maintiennent l'homéostasie valvulaire et, en cas de lésion, s'activent (aVICs) pour réparer efficacement le tissu valvulaire. L'inflammation valvulaire et l'activation des VICs initient la sécrétion de protéines pro-calcifiantes induisant la différenciation des aVICs en obVICs. Enfin, les pVICs, naturellement présentes au sein de la valve (appelées résidentes) ou issues de la circulation sanguine (appelées hématopoïétiques), semblent favoriser le renouvellement cellulaire et peuvent être impliquées dans les processus angiogénique et ostéoblastique.

Bien que décrites, la validation de la culture primaire des VICs par le suivi de ces sous-populations n'avait pas été réalisé et à constituer notre premier objectif. Nous avons ensuite étudié l'implication des voies de signalisation du FT dans le développement de la SA.

Dans le cadre du suivi longitudinal des VICs depuis les valves aortiques humaines contrôles et pathologiques jusqu'à la culture *in vitro* réalisée sur plastique et sur collagène, nous avons tout d'abord montré que les différentes sous-populations étaient présentes au sein de ces valves avec des localisations et des proportions différentes selon l'état physiopathologique du tissu. Après digestion enzymatique de la valve, elles sont toutes retrouvées mais lors de la mise en culture, les pVICs hématopoïétiques ont disparu, quel que soit le support. Nous avons ainsi validé le modèle de culture primaire des VICs tout en mettant en lumière ses limites : absence des pVICs hématopoïétique, activation et différenciation ostéoblastique spontanée des VICs au cours de la culture.

Dans le cadre de l'étude de l'implication du FT dans le développement de la SA, nous avons montré sa colocalisation avec la thrombine et les calcifications de valves pathologiques. A partir de la culture primaire de VICs issues de valves humaines contrôles et pathologiques, nous avons montré que l'expression et l'activité du FT étaient constitutivement plus importantes pour les VICs pathologiques et que son expression pouvait être induite par l'IL1 $\beta$ . De plus, l'activation du FT, en présence de son ligand le facteur VII, induit l'expression de la fibronectine, de la  $\beta$ -caténine et de RUNX2, protéines impliquées dans les processus de fibrose et de calcification. Cette étude suggère ainsi que le FT produit par les VICs est un médiateur clef dans le développement de la sténose aortique.