



HAL
open science

Carence en vitamine K et polymorphisme du gène Vkorc1 chez le rat : vers un nouveau modèle d'étude des calcifications vasculaires

Arnaud Michaux

► **To cite this version:**

Arnaud Michaux. Carence en vitamine K et polymorphisme du gène Vkorc1 chez le rat : vers un nouveau modèle d'étude des calcifications vasculaires. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1036 . tel-02278326

HAL Id: tel-02278326

<https://theses.hal.science/tel-02278326>

Submitted on 4 Sep 2019

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.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1036

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE

Spécialité de doctorat :
Discipline : Biochimie

Soutenue publiquement le 09/03/2018, par :
Arnaud MICHAUX

**Carence en vitamine K et polymorphisme du gène *Vkorc1*
chez le rat : vers un nouveau modèle d'étude des
calcifications vasculaires.**

Devant le jury composé de :

M. Said KAMEL, Professeur à l'Université de Picardie Jules Verne

Rapporteur

Mme. Virginie SIGURET, Professeure, Faculté de Pharmacie

Rapporteuse

M. Hervé KEMPF, Chargé de recherche, Lieux / Nancy Université

Rapporteur

Mme. Lea PAYEN, MCU & HDR, UCBL1

Examinatrice

M. Claude PETIT, Professeur Pharmacie-Toxicologie, INP-ENVT

Examinateur

Mme. Virginie LATTARD, Directeur de recherche, INRA

Directrice de thèse

M. Etienne BENOIT, Professeur, VetAgro Sup

Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au sein de l'unité de recherche USC1233, Rongeurs Sauvages, Risques Sanitaires et Gestion des Populations avec un financement VetAgro Sup. Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans la participation directe ou indirecte, volontaire ou involontaire d'un ensemble de personnes que je tiens tout particulièrement à remercier ici.

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements aux membres du jury : à **M. Said KAMEL**, Professeur à l'Université de Picardie JULES VERNE, à **Mme Virginie SIGURET**, Professeure PU/PH à l'Université Paris Descartes-Faculté de Pharmacie 4 et à **M. Hervé KEMPF**, Chargé de recherche à l'UMR 7365 CNRS / Université de Lorraine pour avoir accepté d'évaluer et d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie également **Mme Léa PAYEN**, maître de conférences HDR à l'Université Claude Bernard Lyon 1 et à **M. Claude PETIT**, Professeur de l'école vétérinaire de Toulouse d'avoir accepté d'examiner mes travaux et de faire partie des membres du jury.

Un grand merci à mes directeurs de thèse : à **Mme Virginie LATTARD**, Directrice de recherche et Responsable de l'équipe « Anticoagulants » de l'USC1233 et à **M. Étienne BENOIT**, Professeur à VetAgro Sup (campus vétérinaire de Lyon) et directeur de l'unité 1233 (RS2GP). Merci de m'avoir accueilli pour un stage il y a déjà 5 ans au sein de votre unité de recherche, d'avoir écouté mon souhait de réaliser une thèse et d'avoir pu rendre cela possible. Merci pour cette opportunité, de m'avoir fait confiance, pour votre gentillesse et pour la dimension humaine indispensable à une sereine atmosphère de travail.

Merci à mes prédécesseurs, **Benjamin, Joffrey** et **Marlène** maintenant partis vers d'autres horizons et qui ont très fortement contribué à l'atmosphère originelle du laboratoire que j'ai tant appréciée. Des histoires drôles, rocambolesques, interminables contées le midi par Benjamin, aux pâtisseries du lundi de Joffrey en passant par la 20^e explication des règles du Korfball par Marlène, que ça m'a manqué... Mention spéciale à **Abdé** l'irréductible, le pilier, le tôlier de l'affaire. Tu étais déjà là à mon arrivée et tu restes fidèle au poste. Je te souhaite une belle continuation et si jamais un objet disparaît à nouveau de ton bureau dis-toi que je ne suis pas très loin...

Merci pour tous ces moments partagés au laboratoire comme à l'extérieur et pour tous les conseils que vous m'avez apportés.

Merci à **Adrien**, mon ami depuis maintenant plus de 25 ans. De l'école Sainte-Madeleine à VetAgro Sup, il y a tant de souvenirs communs qu'il m'est impossible d'en choisir un. Mon seul regret est de ne pas avoir pu co-signer un article avec toi pendant cette thèse. Merci pour tes conseils, et pour avoir été présent dans les bons moments comme dans les moments de doute.

Merci à **Jean-Valery**, d'avoir partagé au quotidien le bureau et d'avoir échangé avec moi autour de problématiques communes. Nous sommes passés à côté d'un travail en synergie, mais nous avons tout de même servi des intérêts communs et je t'en remercie. Je n'oublierai pas nos sessions d'escalades à s'en abimer les mains, nos soirées entre doctorants et nos parties de fléchettes. C'est toujours un plaisir de te voir en dehors du laboratoire et je te souhaite une bonne dernière année et une réussite future.

Merci à **Claire** pour cette belle rencontre. Arrivée presque en même temps que moi et toujours présente. J'ai pris un réel plaisir à travailler avec toi, à échanger sur différents sujets, aussi bien professionnels que plus personnels. Je peux te confier un secret maintenant : si les personnes passent leur temps à te taquiner, c'est qu'elles t'apprécient beaucoup.

Merci **Ludivine** pour toutes nos petites discussions, ton aide à l'animalerie, au laboratoire, pour avoir partagé tes sandwichs quand je mourrais de faim le midi, pour nos petites pauses sur le balcon, pour ton aide sur le logiciel d'animalerie, et pour d'innombrables petites autres choses qui changent le travail au quotidien. Apprendre à bien te connaître m'a pris un peu plus de temps, mais je suis très heureux maintenant de notre complicité.

Merci à **Nolan** de partager avec moi une certaine sensibilité pour les calembours gênants. Tu sais ceux que personne ne comprend à part toi et moi. Voir le dépit sur ton visage à la compréhension du jeu de Meaux est la plus belle réaction que tu puisses me faire. Je compte sur toi pour persévérer dans cette discipline (cipline). Merci également d'avoir apporté une nouvelle dimension à l'USC1233 avec tes connaissances en modélisation. Ta manière d'expliquer les choses les rendent simples et très intéressantes. J'aurais aimé t'avoir comme enseignant.

Merci à **Solange, Edwige et Élodie**, d'avoir toujours trouvé du temps pour passer mes échantillons « urgents » et avec le sourire en prime. J'ai toujours pris plaisir à descendre un étage, traverser un long couloir et en remonter 1, et parfois plusieurs fois par jours, pour venir vous voir et parfois en profiter pour emprunter un (gros) coin de paille, des pipettes, des tubes, des cônes, la liste est longue. On se sent bien en "bioch" ! Merci pour votre patience

et votre gentillesse. Merci également à **Damien** et **Julien**, c'est toujours un plaisir de vous revoir. Merci à l'ensemble du service de biochimie.

Merci à **Lucas** d'avoir poussé les portes de VétAgro Sup par un mois de juillet 2013 pour un stage volontaire de licence et d'avoir atterri après, d'un commun désaccord, dans notre unité. Je n'imaginais pas alors que le fait de visionner l'épisode 1 de Denver avec un stagiaire laissé à son sort aboutirait quelques années plus tard à une forte amitié. Cette même amitié qui nous pousse à courir ensemble la Sté-Lyon par une nuit de décembre sur un coup de tête juste pour le plaisir de se challenger. Je suis admiratif de ton parcours depuis nos sessions Q-PCR à aujourd'hui. Merci de me donner envie de me dépasser chaque jour et tout simplement d'être là.

Merci à **Shira** d'avoir apporté de l'enthousiasme, un rire communicatif, de la simplicité et une énergie folle au laboratoire. J'aurai adoré que tu puisses continuer un peu plus longtemps à partager le bureau avec JV et moi le temps d'une thèse. Je n'ose même pas imaginer ce qu'aurait pu donner cette cohabitation.

Un grand merci aux étudiants de BTS/IUT, **Valentin, Manon, Célia, Clément**, que j'ai pris un réel plaisir à encadrer le temps d'un stage. J'espère que vous avez autant appris de moi que ce que j'ai pu apprendre de vous. La transmission des connaissances devrait toujours aller dans les deux sens. Merci également pour votre aide précieuse et le temps que vous m'avez fait gagner pendant les différentes expérimentations.

Bonne chance à **Rami** et **Thomas** qui assurent la relève de thèse et à **Auréli**e qui approche bientôt de la fin. Merci de continuer à faire vivre la lignée des « doctorants RS2GP ».

Une petite pensée aux différentes personnes qui ont « traversé » l'équipe le temps d'un stage ou d'une thèse vétérinaire. Je pense particulièrement à **Audrey, Suha, Séléna, Maylis, Romain, Roxane, Hélène, Marion**. Merci d'avoir apporté une pointe de renouveau, de fraîcheur et pour votre grande sympathie.

Merci aux étudiants vétérinaires qui malgré un soleil resplendissant du mois de juillet ou d'août ont pour certains pris avec plein de bonne humeur et de motivation leurs 2 semaines de « formation à la recherche » au sein notre laboratoire. Mention spéciale à **Lorris et Louis** qui ont montré qu'en 2 semaines il était possible à la fois d'observer, d'apprendre des techniques et d'apporter une aide précieuse, le tout dans une bonne ambiance.

Merci à **Lucie, Christelle et Magda** avec qui on aura essayé de créer un groupe de doctorants digne de ce nom sur le campus vétérinaire de Lyon. Cette mission semble plus ardue que la réalisation d'une thèse, bon courage aux prochains. Cela nous aura au moins permis de nous retrouver et d'avoir des échanges enrichissants.

Merci à **mes Lyonnais(es)** pour ces 5 années riches en événements et en souvenirs. **Audrey, Benoit, Marine, Matthieu, Sandra, Lycia**, la liste est longue... Cette fin de thèse signifie également le départ de Lyon, mais ne vous y trompez pas, cette ville reste dans mon cœur tout comme vous. I'll be back.

Merci à **Mes Parents** de m'avoir toujours laissé la possibilité de m'épanouir dans mes choix, aussi bien d'étude que de vie. J'ai toujours eu pour leitmotif d'aller travailler avec l'envie. Je pense que cet objectif est aujourd'hui définitivement atteint grâce à vous. Toutes ces années passées sur les bancs de la fac, de jobs étudiants, de changements d'appartement et de villes, de thèses, trouvent aujourd'hui tout leur sens. Un merci sans fin pour tout. Au placard la pudeur, je vous aime.

Une grosse pensée pour **Khédidja**, les personnes partent, mais les souvenirs restent ... Tu nous manques.

RÉSUMÉ

La vitamine K permet l'activation biologique de 14 protéines identifiées à ce jour et qualifiées de "vitamines K dépendantes" (PVKD). Ces PVKD peuvent être d'origine hépatique et jouer un rôle important dans l'hémostase ou être extrahépatiques et intervenir dans l'équilibre phosphocalcique, énergétique ou encore l'inflammation. Un recyclage très efficace de la vitamine K par l'enzyme *VKORC1* permet d'en limiter grandement les besoins nutritionnels, ce qui explique que la carence totale pour cette vitamine n'est pas décrite dans la population générale. Chez certaines personnes, une subcarence pourrait cependant exister et contribuer au développement de calcifications de la média des parois vasculaires et augmenter ainsi le facteur de risque cardio-vasculaire. Ce type de calcification est retrouvé chez les personnes hémodialysées, présentant un diabète ou tout simplement au cours du vieillissement. Le lien entre cette subcarence et les calcifications vasculaires est difficilement étudiable chez l'Homme du fait d'une évolution lente et d'effets pouvant être masqués par d'autres facteurs environnementaux. Pour pouvoir étudier directement ce phénomène, un modèle animal a été développé et caractérisé. Des rats sauvages présentant une mutation simple sur le gène *Vkorc1* ont été croisés sur 10 générations avec des rats de laboratoire de type sprague-dawley. La lignée ainsi créée, dispose d'un fond génétique de rat de laboratoire et n'est mutée que pour le gène *Vkorc1*. Cette mutation augmente fortement leur besoin en vitamine K dans l'alimentation du fait d'un recyclage fortement altéré. En outre, un régime alimentaire déficient en vitamine K a été administré à ces rats pendant plusieurs semaines.

Après 12 semaines de subcarence, les rats mâles présentaient des calcifications vasculaires médiales importantes de l'aorte, des poumons, des testicules et du cœur, et ces calcifications augmentent proportionnellement avec la durée de la restriction. La coagulation est maintenue bien qu'une diminution de l'activité des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants soit observée. La matrix-gla-protéine tissulaire ainsi que l'ostéocalcine plasmatique, qui sont des PVKD impliquées dans l'inhibition des calcifications vasculaires, sont retrouvées accumulées sous leur forme inactive. Dans le même temps, la concentration en vitamine K tissulaire est très fortement diminuée. Ces résultats ne sont pas observés chez les rats non mutés subcarencés ni chez les rats mutés non-subcarencé. De manière générale la subcarence n'a qu'un impact limité chez les femelles bien que de légères calcifications vasculaires soient également observées.

Les tentatives de subcarences en vitamines K chez des rats spragues dawleys sont soit sans effets sur l'apparition de calcifications vasculaires soit ils se traduisent par une forte mortalité par hémorragie témoignant d'une marge très étroite entre carence et subcarence chez ces animaux. Dans notre modèle, cette marge est artificiellement augmentée. Le peu de vitamine K disponible apporté par l'alimentation ou par l'activité de coprophagie se retrouve prioritairement utilisé par le foie permettant ainsi la synthèse des PVKD hépatiques impliquées dans la coagulation. Les tissus périphériques sont fortement déplétés en vitamine K et les PVKD extra-hépatiques se retrouvent accumulées sous leur forme inactive.

Ce travail permet pour la première fois de montrer l'existence d'un lien fort entre subcarence en vitamine K et calcifications vasculaires. Ce modèle de subcarence qui est simple à mettre en place et non invasif pourrait servir à une meilleure compréhension du rôle des différentes PVKD extra-hépatiques. Il constitue également un modèle de choix pour l'étude des calcifications médiales et de leurs évolutions.

Mots-clés : Vitamine K, Phylloquinone, Ménaquinone, subcarence, *VKORC1*, *VKORC1L1*, minéralisations vasculaires, rat, MGP, Ostéocalcine, PVKD.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	1
RÉSUMÉ	5
TABLE DES MATIÈRES	6
LISTE DES ABRÉVIATIONS	10
LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX	16
1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	17
2 BIBLIOGRAPHIE.....	19
2.1 Les vitamines K	19
2.1.1 Historique :	19
2.1.2 Définition, structures et propriétés physico-chimiques.....	20
2.1.3 Recommandations nutritionnelles	22
2.1.4 Rôles physiologiques de la vitamine K.....	24
2.1.5 Métabolisme de la vitamine K.....	25
2.1.5.1 Sources et apports alimentaires.....	25
2.1.5.2 Absorption intestinale	27
2.1.5.3 Transport et distribution tissulaire (figure 3)	27
2.1.5.4 UBIAD1 et bioconversion	29
2.1.5.5 Recyclage de la vitamine K	32
2.1.5.5.1 GGX et γ -carboxylation.....	33
2.1.5.5.2 VKORC1.....	35
2.1.5.5.2.1 Généralités	35
2.1.5.5.2.2 Mécanisme catalytique	37
2.1.5.5.2.3 Mutations du gène VKORC1 chez le rat	38
2.1.5.5.3 VKORC1L1	39
2.1.5.5.4 Partenaires réducteurs.....	41
2.1.5.6 Stockage	42
2.1.5.7 Catabolisme et élimination	43
2.1.6 La carence en vitamines K	44
2.1.6.1 Chez l'homme.....	44
2.1.6.2 Chez le rat.....	45
2.2 Les protéines vitamines K dépendantes (PVKD)	47
2.2.1 Généralités	47
2.2.2 Les PKVD procoagulantes (Facteur II, VII, IX et X)	48
2.2.3 Les PVKD anticoagulantes (Protéine C, S et Z)	48
2.2.4 Protéine matricielle GLA (MGP)	49

2.2.5	Ostéocalcine (OC)	49
2.2.6	Growth arrest specific gene 6 (Gas6)	51
2.2.7	Protéine riche en Gla (GRP)	51
2.2.8	Transthyrélines.....	52
2.2.9	Périostine.....	52
2.3	Les antivitamines K.....	54
2.3.1	Historique	54
2.3.2	Les différents anti-vitamines K.....	54
2.3.3	Utilisation des AVK et répercussions.....	55
2.3.3.1	Chez les rongeurs	55
2.3.3.2	Chez l'Homme	56
2.3.3.3	Métabolisme des AVK	57
2.4	La coagulation sanguine	58
2.4.1	Coagulation sanguine définition et généralités.....	58
2.4.2	Hémostase primaire	58
2.4.2.1	Temps vasculaire	58
2.4.2.2	Temps plaquettaire	59
2.4.3	Hémostase secondaire	60
2.4.3.1	La voie du facteur tissulaire.....	61
2.4.3.2	La voie endogène.....	61
2.4.3.3	La voie commune	61
2.4.4	Hémostase tertiaire.....	62
2.4.5	Exploration de l'hémostase	63
2.4.5.1	Temps de Quick	63
2.4.5.2	Dosage des facteurs de la coagulation	64
2.5	Les minéralisations vasculaires	65
2.5.1	Généralités	65
2.5.2	Calcifications intimes	66
2.5.3	Calcifications médiales	67
2.5.4	Calcifications valvulaires.....	67
2.5.5	Calciphylaxie	68
2.5.6	Mécanismes impliqués dans les calcifications vasculaires.....	68
2.5.6.1	Stress oxydatif	69
2.5.6.2	Hormones et vitamine D	69
2.5.6.3	Apoptose	70
2.5.6.4	Inhibiteurs de la précipitation	70
2.5.7	Modèles de calcifications vasculaires chez le rat	72
2.5.7.1	Avec utilisation d'AVK.....	72

2.5.7.2	Régime riche en phosphate et néphrectomie	73
2.5.7.3	Avec carence en vitamine K.....	74
3	CONTEXTE & OBJECTIFS	75
4	MATERIEL ET METHODES	79
4.1	Animaux.....	79
4.2	Régimes alimentaires	80
4.3	Réactifs	81
4.4	Génotypage	81
4.5	Biochimie	83
4.6	Temps de coagulation et activité des facteurs de la coagulation vitamine K dépendant.....	83
4.7	Calcium tissulaire.....	83
4.7.1	Aspect quantitatif	84
4.7.2	Aspect qualitatif	84
4.7.2.1	Coupes histologiques.....	84
4.7.2.2	Hémalun éosine.....	85
4.7.2.3	Coloration au rouge alizarine	85
4.7.2.4	µCT.....	86
4.8	Vitamine K testiculaire et hépatique	86
4.8.1	Extraction de la vitamine K tissulaire	86
4.8.2	Dosage de la vitamine K tissulaire	87
4.9	Ostéocalcine	87
5	OBJECTIF 1 : Caractérisation de la lignée C139.	88
5.1	Objectif :	88
5.2	Méthodes :	88
5.3	Résumé des principaux résultats :.....	89
5.4	Résultats détaillés :.....	89
5.4.1	Fonction reproductrice.....	89
5.4.2	Croissance et données morphologiques	91
5.4.3	Vitamine K tissulaire	92
5.4.4	Coagulation.....	93
5.4.5	Paramètres biochimiques plasmatiques	93
5.4.6	Calcium tissulaire.....	95
5.5	Conclusion	96
6	OBJECTIF 2 : Evaluation du modèle de subcarence en vitamine K de la lignée C139	97
6.1	Objectifs.....	97
6.2	Méthodes	97
6.3	Résultats résumés	97
6.4	Autres résultats	118

6.4.1	Vitamine K tissulaire	118
6.4.2	Expression de différents transcrits.....	119
6.4.3	Calcifications : effet sexe et temps de régime	119
6.5	Conclusion :	122
7	OBJECTIF 3 : Comparaison du besoin en vitamine K dans différentes lignées.....	123
7.1	Objectif	123
7.2	Méthodes	123
7.3	Résultats résumés	124
7.4	Résultats détaillés.....	124
7.4.1	Expérimentation numéro 1	124
7.4.1.1	Coagulation.....	124
7.4.1.2	Vitamine K tissulaire	125
7.4.2	Expérimentation numéro 2	126
7.4.2.1	Vitamine K tissulaire	126
7.4.2.2	Coagulation.....	127
7.4.2.3	Ostéocalcine plasmatique	129
7.4.2.4	Testostérone plasmatique.....	130
7.5	Conclusion	131
8	OBJECTIF 4 : VKORC1L1	132
8.1	Objectif	132
8.2	Résultats	133
8.2.1	Propriétés de VKORC1L1	133
8.2.2	Vers un inhibiteur spécifique de VKORC1L1.....	145
8.3	Conclusion	147
9	DISCUSSION et perspectives.....	149
9.1	Carence en vitamine K.....	149
9.2	Calcifications vasculaires	153
10	CONCLUSIONS générale	156
11	Bibliographie.....	158

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
<i>ANREF</i>	Apports nutritionnels de référence canadienne
apoC/E	Apolipoprotéines C/E
ARN	Acide ribonucléique
AVK	Antivitamine K
BGP	Bone Gla Protein (=ostéocalcine)
CD36	Transporteur cluster of différenciation 36
CMr	Chylomicrons remnants
cOC	Ostéocalcine gamma-carboxylée
Ct	Cycle seuil
CV	Calcifications vasculaires (= Minéralisations vasculaires)
CYP	Cytochrome P-450
(k)Da	(kilo)Dalton
DTT	Dithiothreitol
<i>EFSA</i>	autorité européenne de sécurité des aliments
ENPP1	ecto-ATPase nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
Gas6	Growth arrest-specific gene 6
GGCX	γ -glutamyl-carboxylase
GGPP	géranylgeranyl pyrophosphate
Gla	Acide aminé γ -carboxyglutamate
Glu	Acide aminé glutamate
GRP	Gla-rich-protein (=Ucma)
PTH	Hormone parathyroïde
HDL	Lipoprotéines de haute densité
IDL	Lipoprotéines de densité intermédiaire
INR	International normalised ratio
IRC	Insuffisance rénale chronique
ISI	Index de sensibilité internationale
KH	Vitamine K quinone
KH ₂	Vitamine K hydroquinone
Ki	Constante d'inhibition
KM	Constante de Michaelis-Menten
KO	Knock out

Kox	Vitamine K époxyde
K ₁ ox	Vitamine K ₁ époxyde
LDLR	Récepteur aux lipoprotéines de basse densité
LRP	Protéine liée au récepteur des lipoprotéines de faible densité
Mb	Méga base
MGP	Protéine-gla-matricielle
MK	Ménaquinone
MKn	Ménaquinone n (avec 4<n<13)
MD	Ménadione
NPC1L1	Transporteur Niemann-Pick C1 like 1
OC	Ostéocalcine (=BGP)
OST-L	Osteoblaste-like
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDI	Protéine disulfure isomérase
PIVKA-II	Prothrombine induite par une absence en vitamine K
PK	Phylloquinone
pNA	paranitroaniline
PTH	Parathormone
PVKD	Protéine vitamine K-dépendante
qPCR	quantitative polymerase chaine reaction
RANK-L	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
ROS	Espèces réactives en oxygènes
rpm	Rotation par minute
SD	Sprague-Dawley
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSCD	Schnyder cristalline cornéal dystrophy
SR-BI	Transporteur scavenger receptor class B type I
SXR/PXR	récepteurs nucléaires des stéroïdes et xénobiotiques
TCC	Cellules urothéliales transitionnelles
TERE1	Transitionnal epithelial response gene 1
TLR	Lipoprotéines riches en triglycérides
TTR	Transthyréine
TQ	Temps de Quick
UBIAD1	UbiA prenyltransferase domain containing 1
ucMGP	Protéine-gla-matricielle non-gamma-carboxylée
ucOC	Ostéocalcine non-gamma carboxylée
USC	Unité sous contrat

VKCFD2	Vitamin K Clotting Factor Deficiency 2
VKOR (activité)	(activité) vitamine K époxyde réductase
VKORC1	Vitamine K époxyde réductase sous-unité 1
Vkorc1 ^{C139/C139}	Rats sauvages avec la mutation C139 à l'état homozygote
VKORC1L1	VKORC1-like 1
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
VSMC	Cellules vasculaires musculaires lisses

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique des différentes vitamines K. (a) Ménadione (b) Phylloquinone (c) Ménaquinone.....	21
Figure 2 : Exemples d’analogues de vitamines K synthétiques. Adapté de « Structure-activity relationship of novel menaquinone-4 analogues: modification of the side chain affects their biological activities. J. Med. Chem. 55, 1553–1558. » (Suhara et al., 2012).	22
Figure 3 : Absorption intestinale et distribution tissulaire de la vitamine K : exemple de la MK7 et PK. D’après « Metabolism and cell biology of vitamin K » (Shearer and Newman, 2008).....	28
Figure 4 : Topologie d’UBIAD1. Adapté de « Ectopic expression of the TERE1 (UBIAD1) protein inhibits growth of renal clear cell carcinoma cells: Altered metabolic phenotype associated with reactive oxygen species, nitric oxide and SXR target genes involved in cholesterol and lipid metabolism » (Fredericks et al., 2013). En vert les domaines CRAC et FARM. Encerclées en rouge, différentes mutations impliquées dans la SSCD.	29
Figure 5 : Formation de ménaquinone-4 à partir de phylloquinone ou ménadione et de GGPP. D’après « Menadione (Vitamin K3) is a Catabolite Product of Oral Phylloquinone (Vitamin K1) in the Intestine and a Circulating Precursor of Tissue Menaquinone-4 (Vitamin K2) in Rats » (Hirota et al., 2013b). 31	
Figure 6 : Cycle de la vitamine K.....	33
Figure 7 : Topologie de la GGCX. Site de reconnaissance du propeptide (bleu), site de reconnaissance des résidus glutamates (orange), site de liaison entre les 2 cystéines (jaune), site de déprotonation des résidus (rouge). Issu de « Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle » (Tie and Stafford, 2016).....	34
Figure 8 : Réaction de γ -carboxylation d’une PVKD.....	34
Figure 9 : Topologie de la VKORC1 humaine. En bleu les 4 hélices transmembranaires, en violet la boucle luminale, en vert les 4 cystéines du site actif et en gris la membrane du réticulum endoplasmique.....	36
Figure 10 : Mécanisme catalytique de VKORC1. Adapté de « Chemical model studies for the mechanism of vitamin K epoxide reductase » (Silverman, 1981).....	37
Figure 11 : Répartition des différents polymorphismes de VKORC1 chez <i>Rattus norvegicus</i> . D’après « The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. » (Pelz et al., 2005).....	38
Figure 12 : Topologie de VKORC1L1. D’après « VKORC1 and VKORC1L1: Why do Vertebrates Have Two Vitamin K 2,3-Epoxy Reductases? » (Oldenburg et al., 2015b).....	41
Figure 13 : Catabolisme de la vitamine K.	43
Figure 14 : Rôle de l’os dans le métabolisme énergétique médié par l’ostéocalcine	50
Figure 15 : Les principales familles d’AVK et leurs dérivés. (A) le noyau 4-hydroxycoumarine et le coumafène, brodifacoum et bromadiolone, (B) le noyau 4-hydroxy-thiocoumarine et la diféthialone, (C) le noyau indiane-1,3-dione et la fluindione.....	55

Figure 16 : hémostasie primaire.....	59
Figure 17 : Version simplifiée de la cascade de la coagulation.	62
Figure 18 : Les différents types de calcifications vasculaires.	66
Figure 19 : Les différents mécanismes impliqués dans la différenciation des VSMC en cellules de type ostéoblastiques.	69
Figure 20 : Stratégie mise en place pour la création de la lignée C139	80
Figure 21 : Temps entre la présentation du mâle à la femelle et la mise bas (gauche) et taille des portées à la naissance (droite). Résultats en fonction du croisement entre les 3 différents génotypes. n=11 par groupe.	90
Figure 22 : Courbe de poids chez les rats mâles en fonction des 3 génotypes de Vkorc1 (YY, YC, CC) sous régime standard avec ménadione pendant 12 mois. n=18 de 0 à 6 mois et n=9 de 6 à 12 mois (n=17 pour le groupe YC de 9 à 12 mois pour cause de mortalité avec absence d'hémorragie.....	92
Figure 23 : MK4 (à gauche) et MK4ox (à droite) testiculaire à l'âge de 6 mois exprimée en % du groupe YY. n = 6 par groupe. * P < 0,05 avec le groupe YY.	92
Figure 24 : Quantité de MK4 dans les testicules des rats homozygotes C139 à l'état basal (S0) et après 3 (S3) et 12 (S12) semaines de régime avec ou sans ménadione. Données exprimées en moyenne \pm SD du groupe YY S0. n = 6 à 15 par groupe. **** p < 0,0001 avec S0.....	118
Figure 25 : Expression de différents ARNm dans le foie (A) et dans les testicules (B) de rats mâles homozygote C139 sous régime avec K3 (vert) et sans K3 (rouge) après 12 semaines. Données exprimées en moyenne \pm E.T. * p<0.005. n=6 par groupe.	119
Figure 26 : Calcium testiculaire chez des rats homozygotes C139 soumis à un régime standard A04 avec ménadione (vert) et sans ménadione (rouge) pendant 4, 8 et 12 semaines. * p<0,05 avec le groupe avec ménadione à 4 semaines. N = 4 à 13 par groupe.....	120
Figure 27 : Volume des calcifications testiculaires en mm ³ chez des rats homozygotes C139 soumis à un régime A04 sans ménadione pendant 17, 32, 49, 60, 90 et 150 jours. N = 3 par groupe.	121
Figure 28 : Calcium en mg/g dans les reins (A) et l'aorte (B) chez des rats mâles et femelles CC soumis à un régime avec (vert) ou sans (rouge) ménadione. N = 4 à 9 par groupe. ** p<0,05 avec mâles CC, ***p<0,01 avec mâles CC.....	121
Figure 29 : Coloration au rouge alizarine d'aortes de rats mâles (A, B, C) et femelles (D, E) homozygotes C139 sous régime avec (A, D) ou sans (B, C,E) vitamine K3 pendant 12 semaines.	122
Figure 30 : Evolution des facteurs de la coagulation X, II et IX chez les mâles et les femelles YY et CC sous régime synthétique sans ménadione.....	125
Figure 31 : MK4 testiculaires chez les rats YY (noir) et CC (bleu) sous régime synthétique sans ménadione pendant 16 jours. Valeurs exprimées en % du groupe YY J0. n=5 à 9 par groupe.....	126
Figure 32 : MK4 testiculaire exprimé en % du groupe J0 SD chez des rats Sprague-dawley (noir), F139 (vert), C139 (bleu), Hamphsire (orange) sous régime synthétique sans ménadione pendant 12 jours. * P<0,05. n=4 à 6 par groupe.	127

Figure 33 : Facteur II chez des rats mâles SD, CC, FF et QQ après 0, 4, 8 et 12 jours de régime synthétique sans ménadione.	128
Figure 34 : Temps de quick chez les rats mâles SD, CC, FF et QQ après 0, 4, 8 et 12 jours de régime synthétique sans ménadione.	128
Figure 35 : Ostéocalcine plasmatique non-gamma-carboxylée chez des rats mâles SD et homozygotes C139 soumis à un régime synthétique sans ménadione pendant 12 jours. Valeurs exprimées en pourcentage du groupe SD J0. N = 4 à 6 par groupe.....	129
Figure 36 : Testostérone plasmatique.....	130
Figure 37 : Exemple de chromatogrammes après 1 jour (a), 2 jours (b) et 6 jours (c) d'administration de 5 mg/kg par gavage de l'inhibiteur "A" de VKORC1L1. (d) foie blanc supplémenté avec 0,144 µg/g de composé « C ». Encerclé en rouge : pic correspondant au composé « C ». Encerclé en vert : métabolites non identifiés du composé « C ».	146
Figure 38 : Concentration hépatique en µg/g de l'inhibiteur "C", 1, 2 et 6 jours après un gavage à 5mg/kg. Résultats exprimés en moyenne (E.T). n = 2 à 3 par groupe.	147

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des 5 principales vitamines K.....	21
Tableau 2 : Apports nutritionnels de référence canadienne (ANREF) pour la vitamine K.	23
Tableau 3 : Valeurs nutritionnelles de références pour la vitamine K. EFSA 22 mai 2017.	23
Tableau 4 : Teneur en phylloquinone de certains aliments. D'après « Vitamin K1 (Phylloquinone) Content of Foods : À Provisional Table » (Booth et al., 1993).	26
Tableau 5 : Les différentes protéines vitamines K dépendantes, leurs rôles et leurs distributions tissulaires.....	47
Tableau 6 : Les différents facteurs de la coagulation et leurs inhibiteurs.	60
Tableau 7 : Répartition des 3 différents génotypes et du sexe après croisements de rats YC*YC. Résultats exprimés en pourcentages et valeurs absolues pour 292 rats. Tes chi-2.....	89
Tableau 8 : données morphologiques de rats mâles YY, YC et CC sous régime SAFE A04 pendant 6 mois. n = 11 par groupe. Valeurs exprimées en moyenne +ET.....	91
Tableau 9 : données plasmatiques de marqueur de l'équilibre ostéocalcique (Calcémie et phosphatémie), de la fonction rénale (créatinine), de l'inflammation (CRP), de la fonction hépatique (PAL/ALAT) et de la coagulation (temps de quick et prothrombine) chez des rats mâles YY, YC, CC âgés de 12 mois sous régime standard SAFE A04. # p<0,05 avec CC, * p<0,01 avec YY, * p<0,001 avec YY.95	
Tableau 10 : Calcium tissulaire en µg/g à l'âge de 6 mois et de 12 mois avec un régime standard SAFE A04. Résultats en fonction des 3 génotypes YY YC et CC. n = 9 par groupe.	96

1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

La vitamine K désigne une famille de molécules possédant toutes un noyau naphthoquinone permettant une modification post transcriptionnelle de certaines protéines, la gamma-carboxylation, en agissant comme cofacteur avec l'enzyme gamma-glutamyl-carboxylase.

Cette gamma-carboxylation va permettre l'activation biologique de certaines protéines dites "vitamines K dépendantes" (PVKD) en leur conférant une affinité importante pour les cations divalents et tout particulièrement pour le calcium.

Ces PVKD peuvent être d'origine hépatique et intervenir alors dans la coagulation sanguine ou être extra-hépatiques et jouer un rôle dans le métabolisme phosphocalcique, énergétique ou encore l'inflammation.

Pendant cette réaction de gamma-carboxylation la vitamine K disponible sous forme hydroquinone est oxydée en vitamine K époxyde. Cette vitamine K époxyde pourra être recyclée plus de 500 fois par l'action de l'enzyme VKORC1 permettant ainsi de réactiver à nouveau une PVKD.

Ce recyclage efficace de la vitamine K, permet en condition normale d'en limiter les besoins nutritionnels, et il n'est pas décrit de phénomène carence pour cette vitamine, dans la population générale.

Chez certaines personnes, une subcarence en vitamine K pourrait cependant exister et contribuer au développement de calcifications vasculaires de types médiales.

Ces calcifications sont retrouvées chez les personnes hémodialysées, présentant un diabète de type II ou tout simplement au cours du vieillissement.

L'impact de cette subcarence est difficilement étudiable chez l'Homme du fait d'une évolution lente et d'effets pouvant être masqués par d'autres facteurs environnementaux.

Pour pouvoir étudier directement ce phénomène de subcarence et de ses phénomènes associés, il serait très utile de disposer d'un modèle animal.

L'administration d'un régime pauvre en vitamine K chez des rats standards de laboratoire engendre une forte mortalité par hémorragie au bout de quelques jours ou reste sans aucun effet et aucune minéralisation vasculaire n'est observée. Cela témoigne d'une marge extrêmement étroite entre carence et subcarence chez ces animaux.

Certains rats sauvages sont porteurs de SNP sur leur gène *Vkorc1* responsable du recyclage de la vitamine K. Ces mutations ponctuelles apportent l'avantage d'une résistance aux anticoagulants anti-vitamines K (AVK) dont la cible d'inhibition est *Vkorc1*. En contrepartie, ces

rats présentent un recyclage altéré de cette vitamine et les besoins nutritionnels sont alors fortement augmentés. C'est le coût biologique de la mutation.

Chez certains de ces animaux et notamment chez les vieux mâles il a déjà été observé des minéralisations de l'aorte et de certains vaisseaux des tissus périphériques. Ce dernier élément peut laisser penser qu'un lien entre subcarence en vitamine K et calcification vasculaire existe bien chez ces animaux.

L'USC1233 dispose de plusieurs lignées de rats sauvages dont le gène *Vkorc1* muté a été transmis par introgression sur plusieurs générations dans une lignée de rats de laboratoires de type sprague-dawley.

Notre hypothèse centrale pour ce travail est qu'en administrant un régime pauvre en vitamine K chez ces rats-là, il serait possible d'établir un état de subcarence ce qui n'a jamais pu être observé chez les rats standards de laboratoire. Le lien fort entre subcarence et calcifications vasculaires serait également établi.

Ces animaux en développant des minéralisations vasculaires spontanées pourraient alors servir de modèle d'étude pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes de développement des calcifications médiales également observées chez l'Homme.

D'une manière plus générale, ce modèle servirait à une meilleure compréhension du métabolisme de la vitamine K et notamment aux rôles des différentes PVKD extrahépatiques.

La partie suivante de bibliographie reprend de manière plus détaillée les différents concepts développés dans cette introduction.

2 BIBLIOGRAPHIE

2.1 Les vitamines K

2.1.1 Historique :

En travaillant sur le métabolisme du cholestérol en 1929 le biochimiste Danois Henrick Dam a nourrit des poulets avec une alimentation préalablement extraite à l'aide de solvants non polaires pour en retirer les stérols et observa l'apparition de syndromes hémorragiques. Ces hémorragies internes furent observées dans 60-70% des cas avec des premiers cas à 11 jours et plus fréquemment après 15-20 jours. Lorsque l'amidon fut remplacé par des céréales le syndrome disparut et l'ajout d'acide ascorbique ne modifia pas le phénomène. Il en déduisit que ce syndrome était dû à l'absence d'un facteur nutritionnel présent dans les céréales (Dam and Schönheyder, 1934).

En 1935 Henrik Dam a montré que le syndrome hémorragique pouvait être prévenu par l'administration de graines de chanvre ou de foie de porc. L'ajout de vitamine A et D et alpha ou bêta-carotène ne permet pas de prévenir le syndrome hémorragique. Le principe actif antihémorragique a pu être extrait du foie de porc à l'aide d'éther et a été nommé vitamine K du mot « Koagulation » en Danois. Cette vitamine K semble être proche d'un point de vue structural de la vitamine E (Dam, 1935).

En 1936 Henrik Dam propose une unité pour la vitamine K. 1000 unités vitamine K sont nécessaire pour un animal de 333g pendant 3 jours pour lui permettre de retrouver une coagulation normale. Ainsi la luzerne séchée présente 250 unités vitamine K. Différentes méthodes d'extractions et de concentrations ont été étudiées et ont permis d'obtenir un extrait concentré à 600000-1000000 d'unités par gramme. Dans cette étude il est mis en évidence que la vitamine K est assez peu sensible à la chaleur, mais très sensible à la lumière (Dam and Schønheyder, 1936).

En 1939, le chimiste américain Albert Doisy et son équipe ont isolé de manière quasiment pure la vitamine K₁ (Binkley et al., 1939) et la vitamine K₂ (McKEE et al., 1939). Cette même année la synthèse chimique de la vitamine K₁ a été réalisée par la même équipe (Maccorquodale et al., 1939).

Albert Doisy et Henrick Dam se sont partagé le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1943 pour leurs travaux réalisés sur la vitamine K.

2.1.2 Définition, structures et propriétés physico-chimiques

Le terme vitamine K regroupe une famille de molécules apparentées contenant toutes un noyau 1,4-naphtoquinone substitué en position 2 par un groupement méthyle (*figure 1*). Cette forme simple 2-méthyl-1,4-naphtoquinone est aussi appelée ménadione (**MD**) ou vitamine K₃. D'origine synthétique la MD génère de grandes quantités d'espèces réactives de l'oxygène et présente ainsi une cytotoxicité importante au niveau des hépatocytes (Thor et al., 1982) ou des érythrocytes (H. Trad and Butterfield, 1994). Dans certains cas liés à l'hérédité ou à des doses importantes, elle a été associée à des anémies hémolytiques ou une hyperbilirubinémie chez l'enfant (Pediatrics and Nutrition, 1961). Pour ces raisons elle est absente de l'alimentation humaine, mais elle reste régulièrement utilisée en nutrition animale et chez les rongeurs de laboratoire (Fu et al., 2007) (McDowell, 2012). Contrairement aux autres formes plus complexes de la vitamine K, elle ne possède pas directement d'activité biologique sur la coagulation et sert de précurseur à d'autres formes actives (Buitenhuis et al., 1990a) (Krossøy et al., 2010), (Hirota et al., 2013a). Elle peut être considérée par conséquent comme une provitamine K. Les différentes formes de vitamines K se distinguent en fonction de la longueur et du type de la chaîne carbonée en position 3 sur le noyau naphtoquinone.

Lorsque cette chaîne carbonée est de type phytyle, on parle de phyloquinone (**PK**) ou vitamine K₁ (*figure 1b*). La PK est synthétisée uniquement par les plantes, les algues vertes et certaines cyanobactéries (Basset et al., 2016). On la retrouve par conséquent principalement dans les légumes verts et cette forme est en apport majoritaire dans l'alimentation humaine. C'est la première des formes à avoir été découverte et elle sert actuellement comme médicament de référence en cas d'intoxication aux antivitamines K comme la warfarine. (Tran et al., 2014), (Hirsh et al., 2003).

Si la chaîne carbonée est de type prényle, on parle de ménaquinone (**MK**) (*figure 1c*). Cette chaîne isoprène peut être répétée de 4 à 13 fois. On distingue ainsi la ménaquinone-4 (**MK4**), la ménaquinone-7 (**MK7**) ou encore la ménaquinone-9 (**MK9**). La MK4 est la forme de stockage de la vitamine K au niveau des tissus des mammifères alors que les MK à plus longues chaînes comme la MK7 et la MK9 sont d'origine bactérienne. L'apport alimentaire en MK est minoritaire et se retrouve donc principalement dans les viandes et les aliments fermentés comme le natto (aliment japonais à base de haricots de soja) ou encore le miso.

Les vitamines K sont lipophiles. Cette propriété qui peut être appréciée par le logP (*tableau 1*) est due à la nature et à la longueur de leurs chaînes carbonées. Les vitamines K sont aussi thermostables et photosensibles (Ferland and Sadowski, 19, 92).

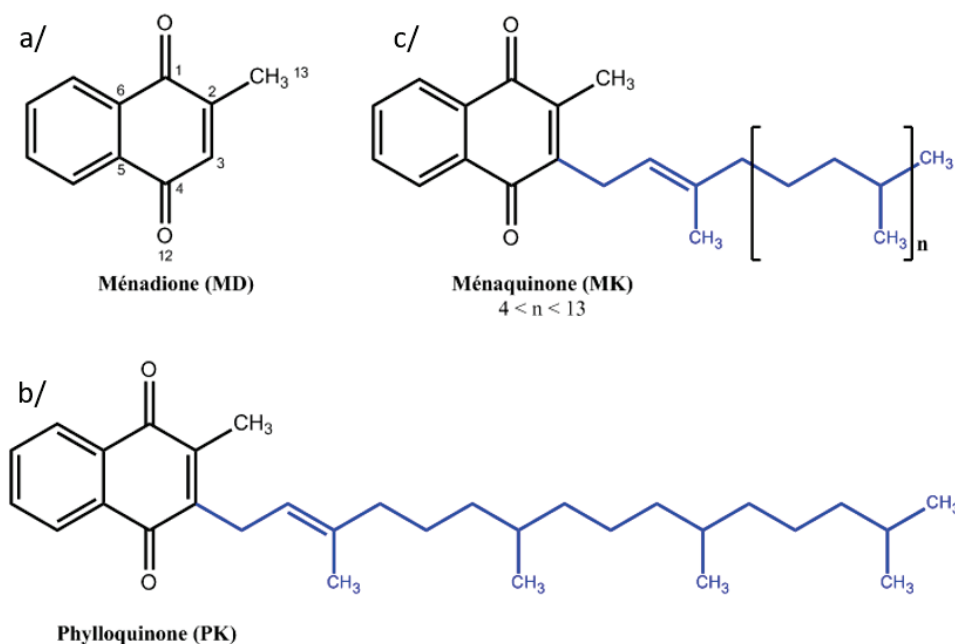


Figure 1 : Structure chimique des différentes vitamines K. (a) Ménadione (b) Phylloquinone (c) Ménaquinone.

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des 5 principales vitamines K.

Molécule	Abréviation	Formule chimique	Masse molaire (g/mol)	Nombre de carbones de la chaîne latérale	logP
Ménadione	MD	C ₁₁ H ₈ O ₂	172,18	0	2,2
Phylloquinone	PK	C ₃₁ H ₄₆ O ₂	450,70	20	9,3
Ménaquinone-4	MK4	C ₃₁ H ₄₀ O ₂	444,65	20	8,5
Ménaquinone-7	MK7	C ₄₆ H ₆₄ O ₂	649,02	35	14
Ménaquinone-9	MK9	C ₅₆ H ₈₀ O ₂	785,25	45	18,2

Depuis la découverte des différentes vitamines K naturelles, de nombreuses molécules analogues ont été synthétisées par différentes équipes et leurs activités biologiques ont été comparées entre elles (Griminger, 1967), (Suhara et al., 2012), (Suhara et al., 2010), (Vermeer et al., 2017) (*figure 2*). Avec leurs structures, leurs pharmacocinétiques et leurs distributions tissulaires légèrement différentes, ces analogues pourraient servir à une meilleure compréhension du métabolisme de la vitamine K.

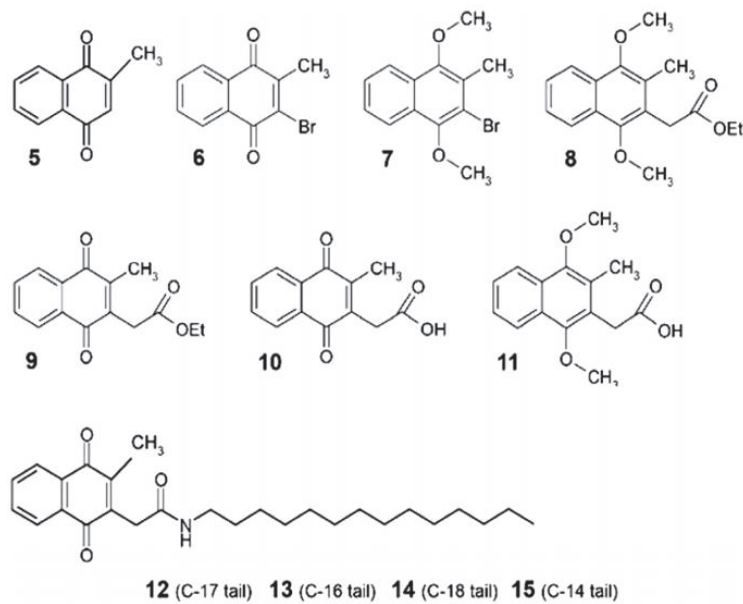


Figure 2 : Exemples d'analogues de vitamines K synthétiques. Adapté de « Structure-activity relationship of novel menaquinone-4 analogues: modification of the side chain affects their biological activities. *J. Med. Chem.* 55, 1553–1558. » (Suhara et al., 2012).

2.1.3 Recommandations nutritionnelles

La première tentative pour déterminer les besoins en vitamine K a été réalisée en 1967 chez des hommes âgés hospitalisés (Frick et al., 1967). Cette quantité a été déterminée à partir de la dose en vitamine K nécessaire pour restaurer la coagulation anormalement perturbée chez ces personnes. Cette étude a abouti à une recommandation de 0,75 à 1 µg/kg/jour. Depuis ces années, le rôle de la vitamine K ne se limite plus au maintien de la coagulation et elle semble aussi impliquée dans de nombreux rôles physiologiques comme le métabolisme osseux, le métabolisme des sphingolipides, le métabolisme énergétique, dans l'inflammation ou encore la prévention du stress oxydatif (Booth, 2009), (Denisova and Booth, 2005), (Li et al., 2003).

Pour évaluer les besoins en vitamine K de manière plus précise en prenant en compte ces nouveaux rôles métaboliques, il y a la nécessité de trouver de nouveaux biomarqueurs. En attendant de pouvoir établir des recommandations plus précises, les apports nutritionnels de référence canadienne (ANREF) présentent des niveaux d'apport suffisant pour la vitamine K plutôt qu'un apport nutritionnel recommandé. Ce niveau d'apport suffisant est basé sur l'apport alimentaire médian en PK des individus en bonne santé apparente de l'enquête NHANES (Trumbo et al., 2001) (tableau 2). Le 22 mai 2017, l'autorité européenne de sécurité des

aliments (EFSA) a établi des valeurs nutritionnelles de références pour la vitamine K dans le cadre de la révision des conseils scientifiques sur les apports nutritionnels (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) et al., 2017). Ces valeurs sont équivalentes à celles établies en 1993 par le groupe d'experts sur les produits diététiques, la nutrition et les allergies (tableau 3).

Tableau 2 : Apports nutritionnels de référence canadienne (ANREF) pour la vitamine K.

	Age	AI (µg/j)
Nouveau-né	de 0 à 6 mois	2
	de 7 à 12 mois	2,5
Enfant	de 1 à 3 ans	30
	de 4 à 8 ans	55
	de 9 à 13 ans	60
	de 14 à 18 ans	75
Homme	après 18 ans	120
Femme	après 18 ans	90
Femme enceinte	< 18ans	75
	> 18ans	90
Femme allaitante	< 18ans	75
	> 18 ans	90

Tableau 3 : Valeurs nutritionnelles de références pour la vitamine K. EFSA 22 mai 2017.

Age	Phylloquinone (µg/j)
De 7 à 11 mois	10
De 1 à 3 ans	12
De 4 à 6 ans	20
De 7 à 10 ans	30
De 11 à 14 ans	45
De 17 à 17 ans	65
18 ans et plus	70

Il existe d'autres recommandations assez similaires dans les autres pays. Le problème majeur est que les études qui ont permis de déterminer ces recommandations ne se sont basées que sur les apports en PK dans la population générale. Il y a un manque de données sur les apports en MK et il n'existe pas de distinction en matière de recommandations entre la PK et les MK. Les nouveau-nés présentent un système de coagulation relativement fragile qui se traduit par un niveau en facteurs de coagulation immatures augmenté. Cela peut s'expliquer par des

« réserves » hépatiques assez faibles à la naissance (environ 5 à 6 fois plus faibles) comparées à l'adulte. La différence observée entre les réserves hépatiques du nouveau-né et de l'adulte est que le nouveau-né ne dispose pas de réserve de MK à longues chaînes alors ces MK à longues chaînes représentent 90% des réserves de l'adulte. Le nouveau-né va acquérir cette réserve au fur et à mesure de la colonisation par la flore microbienne de son tube digestif. Pour ces raisons, et pour prévenir les cas d'hémorragies infantiles, dont le pic se situe entre 3 et 8 semaines, les nouveau-nés sont supplémentés en PK au cours de leurs premières semaines. Les besoins en vitamine K chez le nouveau-né sont aussi plus élevés que chez l'adulte si on les exprime en fonction du poids de corps.

2.1.4 Rôles physiologiques de la vitamine K

Le rôle principal et le mieux décrit de la vitamine K est d'être le cofacteur de l'enzyme γ -glutamyl-carboxylase (*GGCX*) permettant ainsi l'activation de protéines dites vitamines K dépendantes (*PVKD*). En activant ces *PVKD*, la vitamine K joue de nombreux rôles indirects comme le maintien de la coagulation, le maintien de l'équilibre ostéocalcique, la régulation du métabolisme du glucose, la régulation de l'inflammation ou encore la limitation de la prolifération cellulaire. Le fonctionnement de la *GGCX* et la description des différentes *PVKD* sont respectivement détaillés dans les sections 2.1.5.5.1 et 2.2 de ce manuscrit.

La vitamine K possède d'autres rôles secondaires moins connus qui ont fait l'objet d'une revue de littérature par Shearer et al en 2008 (Shearer and Newman, 2008). Ainsi la vitamine K jouerait un rôle dans la lutte contre le stress oxydant, la synthèse des sphingolipides et le développement de certains cancers.

La vitamine K aurait également la capacité de se fixer aux récepteurs nucléaires des stéroïdes et xénobiotiques (*SXR/PXR*) (Tabb et al., 2003). Ces rôles encore méconnus sont interconnectés et peuvent être directement ou indirectement portés par la vitamine K.

2.1.5 Métabolisme de la vitamine K

2.1.5.1 Sources et apports alimentaires

La PK est la forme principalement consommée dans l'alimentation humaine et cet apport se fait par les légumes verts, tels que les épinards ou les brocolis, à hauteur d'environ 60%-90% de l'apport quotidien (Thane et al., 2002), (Booth and Suttie, 1998), (Schurgers et al., 1999). Certains autres végétaux et quelques huiles comme l'huile de soja ou de colza en contiennent aussi des quantités importantes (Ferland and Sadowski, 1992) (Booth et al., 1993) (*tableau 4*). Durant les processus industriels de plus en plus répandus d'hydrogénisation des huiles et des matières grasses, une partie de la PK est transformée en dihydrophyloquinone (Davidson et al., 1996). Cette forme hydrogénée peut représenter une part non négligeable de la vitamine K ingérée quotidiennement (Booth et al., 1996). Peu d'informations sont disponibles pour évaluer les effets d'une telle consommation, mais il a été montré que la dihydrophyloquinone pouvait servir de cofacteur à la GGCX et prévenir les syndromes hémorragiques induits par la warfarine chez le rat (Sato et al., 2003). Cette forme ne semble cependant pas pouvoir se convertir en MK4 comme c'est le cas avec la PK.

Les MK ne représentent qu'un apport minoritaire dans l'alimentation. La MK4 étant la forme de « stockage » de la vitamine K chez les animaux, les principales sources sont les viandes et le jaune d'œuf (Schurgers and Vermeer, 2000). Les produits fermentés tel que le natto, le miso, le chou fermenté ou les fromages sont riches en MK à longues chaînes. Le type de MK produit sera fonction de la souche bactérienne responsable de la fermentation. Ainsi on trouvera dans le natto et le miso une part importante de MK7. Le natto et le miso sont traditionnellement consommés au Japon et peuvent représenter une part importante de l'apport quotidien dans cette population (Kamao et al., 2007). La MK9 et dans une moindre mesure la MK8 vont se retrouver dans les fromages (Manoury et al., 2013).

Tableau 4 : Teneur en phyloquinone de certains aliments. D'après « Vitamin K1 (Phylloquinone) Content of Foods : À Provisional Table » (Booth et al., 1993).

µg Phylloquinone/100 g of edible portion					
<i>Vegetables</i>		<i>Nuts, Oils, Seeds</i>		<i>Fruits</i>	
Kale	817	Soybean oil	193	Avocado	40
Parsley	540	Rapeseed oil	141	Grapes	3
Spinach	400	Olive oil	49	Cantaloupe	1
Endive	231	Walnut oil	15	Bananas	0.5
Green onions	207	Safflower oil	11	Apples	0.1
Broccoli	205	Sunflower oil	9	Oranges	0.1
Brussels sprouts	177	Corn oil	3		
Cabbage	147	Dry soybeans	47	<i>Meat & Dairy</i>	
Lettuce	122	Dry kidney beans	19	Ground beef	0.5
Green beans	47	Sesame seeds	8	Chicken	0.1
Peas	36	Dry navy beans	2	Pork	<0.1
Cucumbers	19	Raw peanuts	0.2	Turkey	<0.1
Tomatoes	6			Tuna	<0.1
Carrots	5	<i>Grains</i>		Butter	7
Cauliflower	5	Bread	3	Cheddar cheese	3
Beets	3	Oat meal	3	3.5% Milk	0.3
Onions	2	White rice	1	Yogurt	0.3
Potatoes	0.8	Wheat flour	0.6	Skim milk	<0.1
Sweet corn	0.5	Dry spaghetti	0.2	Mayonnaise	81
Mushrooms	<0.1	Shredded wheat	0.7	Egg yolk	2
		Corn flakes	<0.1	Egg white	<0.1

Le microbiote intestinal qui est un écosystème complexe et très diversifié est aussi dans une moindre mesure responsable de l'apport quotidien en vitamine K. Certaines bactéries qui le composent sont capables de synthétiser différentes formes de MK indépendamment de l'apport alimentaire. Chez ces bactéries, ces MK servent de partenaire d'oxydoréduction dans la chaîne de transport des électrons et dans la phosphorylation oxydative (Collins and Jones, 1981). Cette synthèse se fait majoritairement au niveau du colon qui représente le plus grand réservoir bactérien du tractus digestif. À cet endroit les espèces bactériennes sont nombreuses, principalement anaérobies strictes, et de type bactéroïdes et bifidobacteria. Chez l'Homme, les MK6 sont synthétisées par *Eubacterium lentum*, MK7 par *Veillonella*, MK8 par *Enterobacteria* et MK10 et MK11 par *Bacteroides* (Fernandez and Collins, 1987), (Conly and Stein, 1992). L'absence de sels biliaires dans cette partie du tube digestif ne permettrait pas cependant une bonne assimilation des différentes MK et le rôle du microbiote intestinal comme acteur de l'apport en vitamine K reste controversé. Certains animaux comme le rat et la souris qui adoptent une activité de coprophagie peuvent cependant trouver dans leurs fèces une source assimilable non-négligeable de MK à longues chaînes.

2.1.5.2 Absorption intestinale

Par sa nature fortement lipophile, l'absorption intestinale de la vitamine K suit celle des lipides. Au niveau du duodénum les lipides sont hydrolysés sous l'action des enzymes pancréatiques et émulsifiés en gouttelettes (micelles) sous l'action des sels biliaires. Ces micelles vont ensuite pouvoir être présentées au niveau de la bordure en brosse des entérocytes et les différents nutriments, dont la vitamine K, vont pouvoir y être absorbés soit par diffusion au niveau de la membrane soit par l'action de transporteurs protéiques. À ce jour plusieurs transporteurs comme Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1), scavenger receptor class B type I (SR-BI), cluster of différentiation 36 (CD36) semblent être impliqués, mais leurs rôles exacts ne sont pas encore clairement déterminés (Goncalves et al., 2014), (Yamanashi et al., 2017), (Reboul and Borel, 2011). Cette phase d'absorption est principalement réalisée dans la partie proximale de l'intestin grêle.

La biodisponibilité de la vitamine K est relativement faible et fortement dépendante de la matrice alimentaire, du type de préparation et de la consommation de lipides. Ainsi la PK contenue dans les légumes verts est six fois moins bien absorbée que sous la forme d'un complément alimentaire en tablette et cette absorption se fait moins rapidement (Garber et al., 1999). La consommation d'un corps gras au moment de la prise alimentaire permet cependant de multiplier par 3 la disponibilité de la PK (Gijsbers et al., 1996). Une étude comparative entre la PK, MK4 et MK9 et la cinétique plasmatique de ces composés a montré une biodisponibilité en MK4 et MK7 inférieur à celle de la PK (Schurgers and Vermeer, 2002). Cette plus faible concentration pourrait s'expliquer soit par une moins bonne absorption des MK à longues chaînes ou à une absorption tissulaire (clairance) plus rapide que celle de la PK ou les deux. Dans le même temps ces mêmes auteurs montrent que la MK7 contenue dans le natto est 10 fois mieux absorbée que la phylloquinone dans les épinards montrant une fois de plus l'importance de la matrice alimentaire dans la biodisponibilité de la vitamine K (Schurgers and Vermeer, 2000b).

2.1.5.3 Transport et distribution tissulaire (figure 3)

Une fois absorbée au niveau des entérocytes la PK va être intégrée au sein des chylomicrons naissants et va rejoindre le réseau lymphatique puis le réseau sanguin *via* le canal thoracique comme n'importe quelle autre vitamine liposoluble (Blomstrand and Forsgren, 1968).

Une fois dans la circulation sanguine, les chylomicrons vont s'enrichir en apolipoprotéines (apoC et apoE) à partir des lipoprotéines de haute densité (HDL).

Au niveau des capillaires sanguins des différents tissus, ces chylomicrons vont perdre leurs triglycérides sous l'action de la lipoprotéine lipase.

Les chylomicrons se retrouvent alors sous la forme de plus petites particules, les chylomicrons remnants (CMr) contenant toujours la vitamine K au sein de leur cœur lipophile.

Ces CMr vont être internalisés par les hépatocytes *via* les récepteurs LDLR et LRP. Une partie de la vitamine K va alors être captée par le foie et une autre partie va être réincorporée au sein des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) contenant des apoB-100 et retourner dans la circulation sanguine. Ces VLDL vont continuer à perdre leur triglycéride sous l'action de la lipoprotéine lipase et se transformer en lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) et LDL.

Les CMr ainsi que les VLDL forment les triglycérides-rich lipoproteins (TLR) qui sont les transporteurs majoritaires de la phyloquinone circulante. Une part plus faible, mais non négligeable de la phyloquinone circulante se retrouve également dans les LDL et HDL (Lamon-Fava et al., 1998).

En dehors du foie, les récepteurs des lipoprotéines LDLR et LRP1 vont permettre d'internaliser à leur tour ces TLR et LDL et capter la phyloquinone.

Il semblerait que les ostéoblastes puisent la phyloquinone majoritairement via les CMr, et les ménaquinones à longues chaînes comme la MK7 via les LDL (Shearer and Newman, 2008).

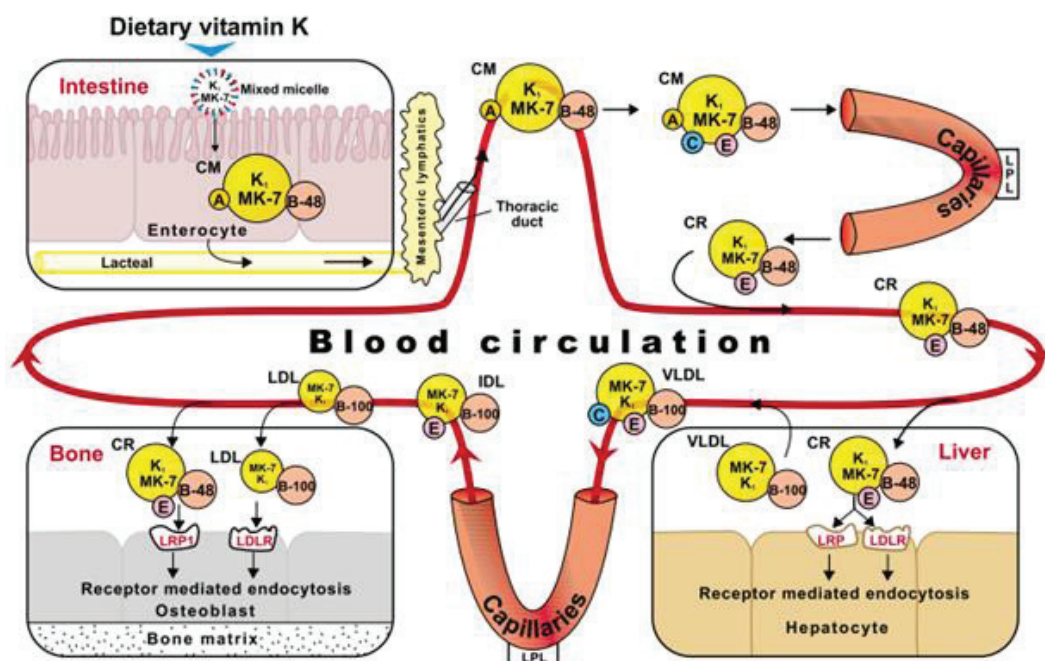


Figure 3 : Absorption intestinale et distribution tissulaire de la vitamine K : exemple de la MK7 et PK. D'après « Metabolism and cell biology of vitamin K » (Shearer and Newman, 2008).

2.1.5.4 UBIAD1 et bioconversion

En 2001 et 2003 l'équipe de McGarvey essaye d'identifier des transcrits qui seraient sous ou sur exprimés au dans des cellules urothéliales transitionnelles (TCC) responsable du cancer de la vessie. Ils identifient un gène nommé TERE1 pour « transitionnal ephithelial response gene 1 » dont les transcrits sont sous exprimés de 61% à 75% dans ces cellules TCC par rapport à des cellules normales (McGarvey et al., 2001), (McGarvey et al., 2003). Ce gène TERE1 ou encore appelé UBIAD1 pour UbiA prenyltransferase domain containing 1 est localisé chez l'Homme au niveau du Chromosome 1p36 entre le microsatellite D1S2667 et D1S434. Il code pour une prényl transférase de 338 AA du même nom pour un poids moléculaire de 36,8 kDa. Cette protéine est composée 10 domaines transmembranaires, une extrémité C-terminale et N-terminale au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique, un domaine CRAC qui est connu pour interagir avec le cholestérol et un domaine FARM (Nickerson et al., 2013) (figure 4).

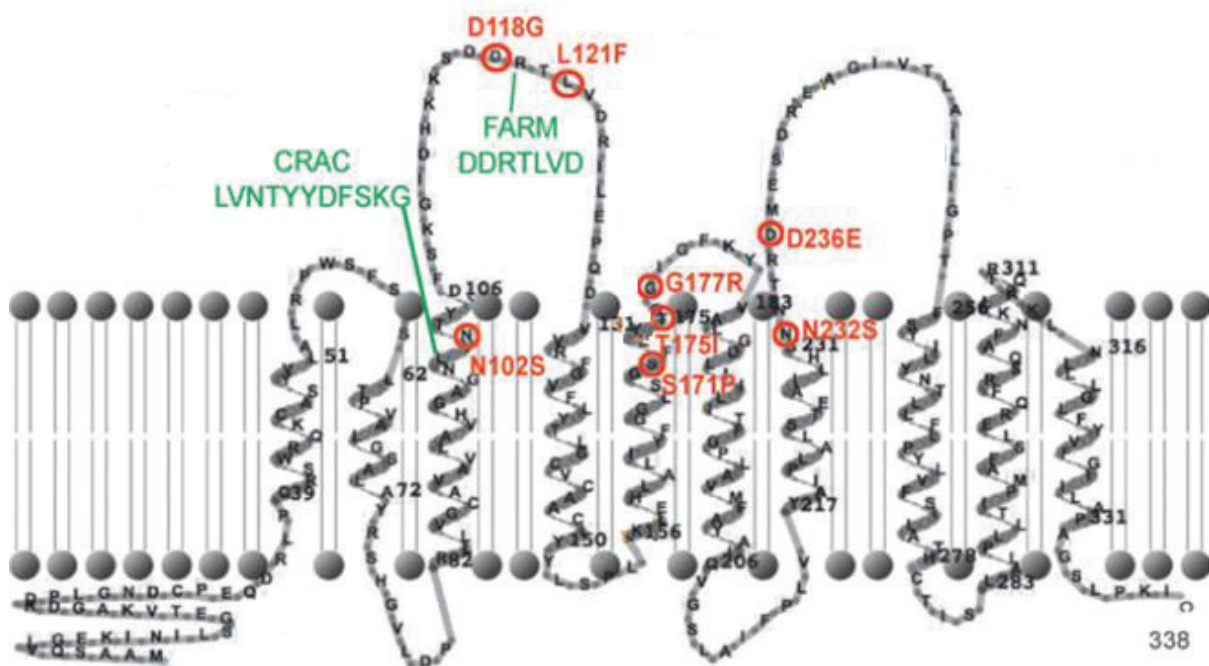


Figure 4 : Topologie d'UBIAD1. Adapté de « Ectopic expression of the TERE1 (UBIAD1) protein inhibits growth of renal clear cell carcinoma cells: Altered metabolic phenotype associated with reactive oxygen species, nitric oxide and SXR target genes involved in cholesterol and lipid metabolism » (Fredericks et al., 2013). En vert les domaines CRAC et FARM. Encadrées en rouge, différentes mutations impliquées dans la SSCD.

UBIAD1 pourrait interagir avec apoE que l'on retrouve dans les chylomicrons et les IDL et jouer ainsi un rôle important dans le métabolisme des lipides (McGarvey et al., 2005). Cela est confirmé lorsqu'en 2007 des mutations au niveau d'UBIAD1 ont permis de montrer son

implication directe dans le développement de la maladie génétique rare appelée « Schnyder cristalline cornéal dystrophy » (SSCD) (Orr et al., 2007). Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1924 par Went puis de manière plus approfondie par Schnyder en 1929. Elle se caractérise par une accumulation anormale de phospholipides et de cholestérol dans la cornée conduisant à son opacification en entraînant ainsi une diminution de l'acuité visuelle. UBIAD1 est la seule enzyme identifiée capable de synthétiser de la MK4 à partir de la PK, MD, mais aussi à partir de la MK4 elle-même.

Une forte corrélation entre les transcrits UBIAD1 et la concentration en MK4 dans les tissus, sauf pour le cœur est aussi mise en évidence (Nakagawa et al., 2010). Cette synthèse est possible grâce à l'activité prényl transférase et se déroule en 2 étapes :

- Dans un premier temps, la vitamine K par voie orale est absorbée au niveau de l'intestin puis clivée. Il y a relargage de ménadione sous sa forme quinone dans le sang et la lymphe.
- Dans un deuxième temps, la MD entre dans les tissus sous sa forme hydroquinone puis est utilisée comme cosubstrat avec de la géranylgéranyl pyrophosphate (GGPP) par UBIAD1 pour former de la MK4 via une réaction de prénylation (Nakagawa et al., 2010) (Hirota et al., 2013b) (*figure 5*).

La GGPP est un métabolite de la voie du mévalonate. Les statines semblent être un inhibiteur d'UBIAD1, mais pas la warfarine (Hirota et al., 2015).

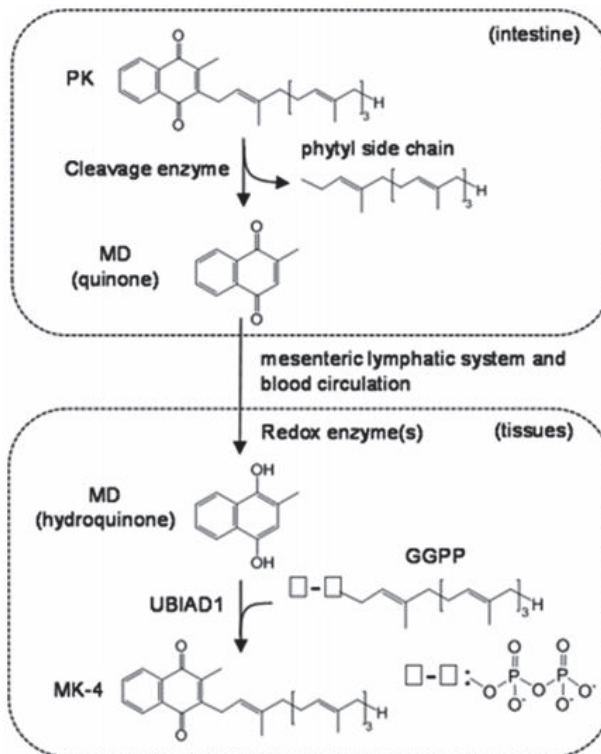


Figure 5 : Formation de ménaquinone-4 à partir de phylloquinone ou ménadione et de GGPP. D'après « Menadione (Vitamin K3) is a Catabolite Product of Oral Phylloquinone (Vitamin K1) in the Intestine and a Circulating Precursor of Tissue Menaquinone-4 (Vitamin K2) in Rats » (Hirota et al., 2013b).

UBIAD1 est indispensable au développement vasculaire embryonnaire aussi bien chez le zébrafish (Hegarty et al., 2013) que chez la souris (Nakagawa et al., 2014). Un modèle de zébrafish présentant un phénotype hémorragique appelé « reh » présente un développement embryonnaire anormal, non viable avec des hémorragies létales. Ce phénotype est lié à une mutation faux-sens en position 65 du gène UBIAD1. L'ajout de MK4 dans des œufs fécondés permet de maintenir la survie embryonnaire, mais pas la PK qui ne peut être convertie sous l'action d'UBIAD1 mutée (Hegarty et al., 2013).

Un knock-out (KO) d'UBIAD1 entraîne également une mort embryonnaire chez la souris entre 7,5 et 10 jours. Cette mortalité embryonnaire peut être repoussée dans le temps en supplémentant la mère en MK4 (Nakagawa et al., 2014). Cela vient confirmer les résultats précédemment obtenus chez le zébrafish.

2.1.5.5 Recyclage de la vitamine K

L'apport alimentaire en vitamine K étant limité, l'organisme a mis en place un système de recyclage efficace permettant le maintien d'une quantité suffisante pour assurer les fonctions biologiques. L'efficacité de ce cycle est telle qu'on évalue à environ 500 fois la capacité de régénération d'une molécule de vitamine K avant son élimination (Chatrou et al., 2011).

Ce recyclage fait intervenir plusieurs enzymes et se déroule de la manière suivante (*figure 6*) :

1 / La vitamine K hydroquinone (KH_2) en présence d'oxygène et de CO_2 sert de cofacteur à la GGCX (*cf section 2.1.5.5.1*) permettant la γ -carboxylation d'une PVKD (*cf section 2.2*).

2/ Cette réaction va aboutir à l'activation d'une PVKD, à l'oxydation de la KH_2 en vitamine K époxyde (Kox) et de la production d'une molécule d' H_2O .

3/ La Kox va ensuite être réduite sous l'action de la vitamine K époxyde réductase complexe 1 (VKORC1) (*cf section 2.1.5.5.2*) et/ou VKORC1 like 1 (VKORC1L1) (*cf section 2.1.5.5.3*) en présence d'une thiorédoxine (*cf section 2.1.5.5.4*) encore non identifiée.

4/ La vitamine K quinone produite (KH) est à nouveau réduite sous l'action de VKORC1, VKORC1L1 et une autre enzyme comportant l'activité VKR, non inhibable par les antivitamines K (AVK), et non encore identifiée.

5/ Sous sa forme KH_2 la vitamine K va pouvoir être réutilisée à l'étape 1 pour l'activation d'une nouvelle PVKD par la GGCX.

6/ Il est à noter que les AVK qui sont des inhibiteurs de VKORC1 et VKORC1L1 entraînent l'arrêt du recyclage de la vitamine K. Cela se traduit par une augmentation de la vitamine K sous forme époxyde et d'une diminution des PVKD γ -carboxylées activées.

L'ensemble de ces étapes forme le cycle de la vitamine K et les différentes enzymes présentées dans ce cycle sont détaillées dans la section suivante.

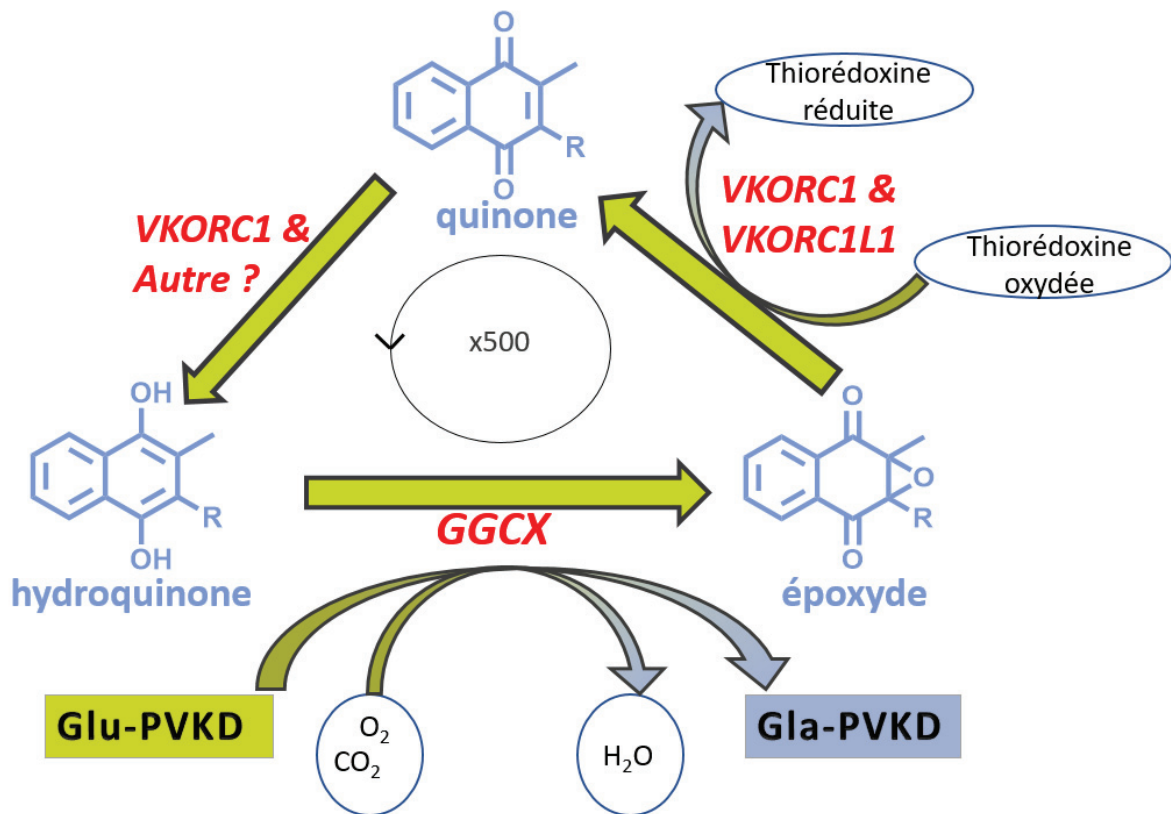


Figure 6 : Cycle de la vitamine K.

2.1.5.5.1 GGCX et γ -carboxylation

La γ -carboxylation est une modification post-traductionnelle essentielle qui convertit spécifiquement les résidus glutamates des PVKD en résidus γ -carboxyglutamates.

Cette activité GGCX a été découverte pour la première fois dans les années 1970 à partir du surnageant issu de la fraction post-microsomale (fraction S10) de foie de rats (Shah and Suttie, 1974), mais la purification de la protéine du même nom n'a été réalisée qu'en 1991 à partir de foie de bœuf (Wu et al., 1991a) après de nombreuses tentatives infructueuses (Hubbard et al., 1989) (de Metz et al., 1981) (Girardot, 1982). La même année, les ADN complémentaires (ADNc) codants pour la GGCX bovine et humaine ont été isolés et clonés par la même équipe (Wu et al., 1991b).

Le gène de la GGCX est localisé sur le chromosome 2 chez l'Homme et est composé de 15 exons pour 13kb. Il code pour une protéine de 758 acides aminés localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Cette protéine est constituée de 5 domaines transmembranaires avec une extrémité N-terminale au niveau du cytoplasme et une extrémité C-terminale au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique (Tie et al., 2000).

La topologie de cette protéine fait apparaître 4 sites spécifiques (figure 7) : un site de reconnaissance du propeptide, un site de reconnaissance des résidus glutamates, un site de liaison entre les 2 cystéines et un site de déprotonation des résidus.

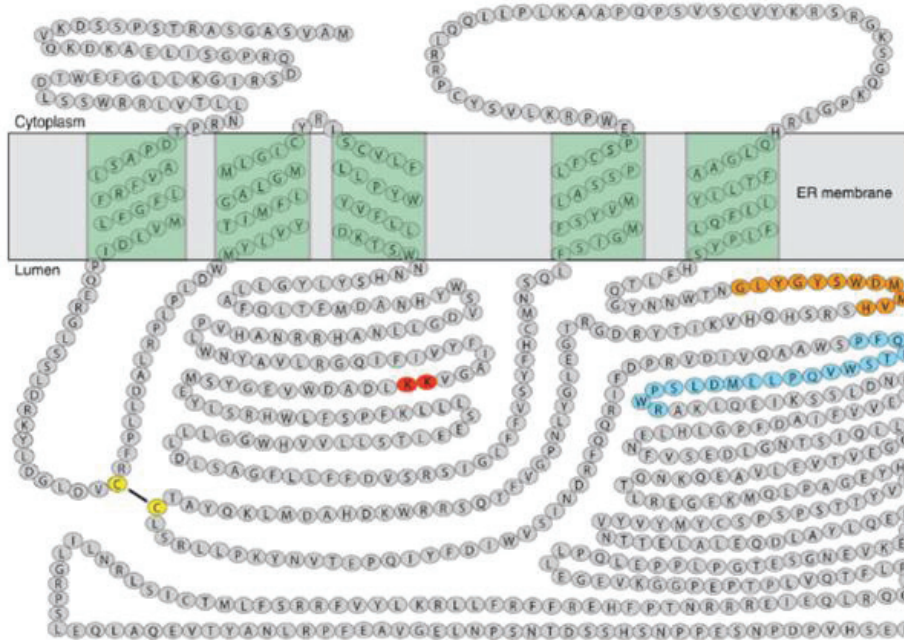


Figure 7 : Topologie de la GGCX. Site de reconnaissance du propeptide (bleu), site de reconnaissance des résidus glutamates (orange), site de liaison entre les 2 cystéines (jaune), site de déprotonation des résidus (rouge). Issu de « Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle » (Tie and Stafford, 2016).

La réaction de γ -carboxylation nécessite la présence de vitamine K sous forme hydroquinone comme cofacteur ainsi qu'une molécule de CO_2 et d' O_2 . À la suite de cette réaction la vitamine K hydroquinone est oxydée en vitamine K 2,3-époxyde (figure 8).

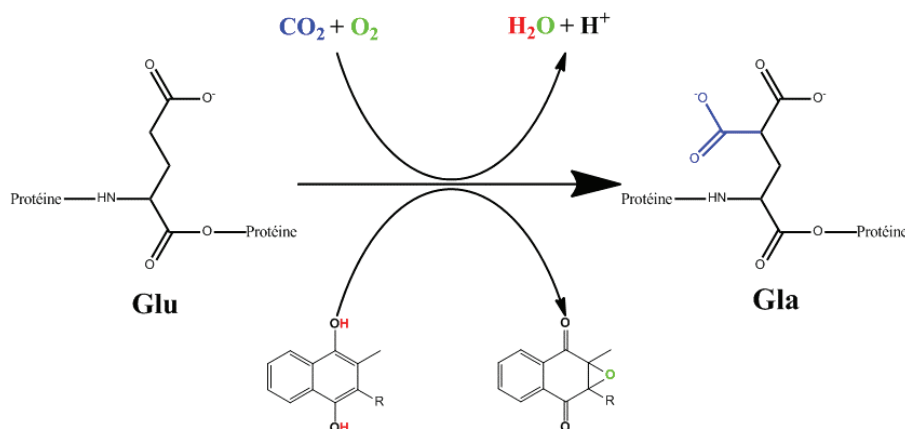


Figure 8 : Réaction de γ -carboxylation d'une PKD.

Toutes les formes de vitamines K ne présentent pas la même affinité pour la GGCX (Yen and Mack, 1980). Il apparait que l'activité GGXC est optimale avec la MK3 comme cofacteur et que plus la chaîne latérale prényle de la MK est grande plus l'activité diminue (Buitenhuis et al., 1990b). La MK4 possède une efficacité 3 fois plus faible que la PK. Il est à noter que la MD n'est pas un cofacteur de la GGCX (Buitenhuis et al., 1990b).

Chez le rat, l'activité GGCX est retrouvée dans la majorité des tissus à l'exception du muscle, des veines et de la membrane osseuse. Le testicule est le seul organe à montrer une activité supérieure au foie (Vermeer et al., 1982).

Un KO de la GGCX à l'état homozygote chez la souris entraîne la mort embryonnaire entre le 9,5^{ème} et 18^{ème} jours dans 50% des cas et les souris arrivant à terme meurent peu de temps après la naissance d'hémorragies abdominales massives (Zhu et al., 2007). Le KO de la GGCX ciblé au niveau du foie permet d'améliorer le phénotype précédent, mais les souris présentent tout de même une mort prématurée et des hémorragies (Azuma et al., 2014).

Chez l'Homme des mutations de la GGCX entraînent des phénotypes multiples dont le plus répandu est un déficit en facteurs de coagulation vitamines K dépendant ou encore des affections au niveau de la peau, semblables à celles observées dans le pseudoxanthome élastique (De Vilder et al., 2017).

2.1.5.5.2 VKORC1

2.1.5.5.2.1 Généralités

L'activité vitamine K époxyde réductase (VKOR) a été décrite pour la première fois en 1970 par Bell et Mastschiner (Bell and Mastschiner, 1970) bien avant que le gène VKORC1 responsable en partie de cette activité ne soit identifié en 2004 (Li et al., 2004) (Rost et al., 2004a).

Ce gène est localisé sur le chromosome 16 chez l'Homme et 1 chez le rat pour une longueur de 5126 paires de bases et 3 exons. Il code pour une petite protéine, du même nom, de 163 acides aminés pour 18 kDa. Cette protéine membranaire se situe au niveau du réticulum endoplasmique avec ses extrémités N-ter et C-term dans le cytoplasme. Initialement proposée avec 3 domaines transmembranaires (Tie et al., 2005) cette conformation a été remise en question après avoir identifié par cristallographie une structure 3D à 4 domaines transmembranaires chez un homologue bactérien ; *Synéchoccus sp* (Li et al., 2010). Deux topologies légèrement différentes à 4 domaines ont été proposées et des travaux récents de

modélisation de deux équipes indépendantes viennent conforter ce résultat (Watzka et al., 2011) (Li et al., 2010) (Czogalla et al., 2016) (Chatron et al., 2017) (figure 9).

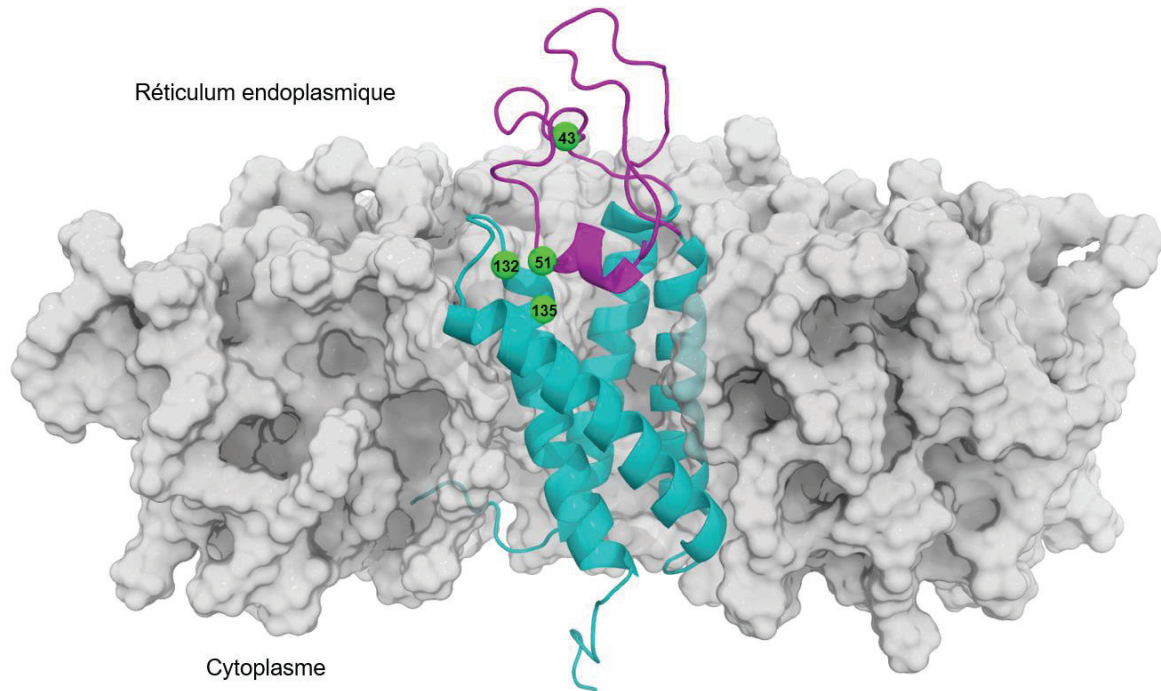


Figure 9 : Topologie de la VKORC1 humaine. En bleu les 4 hélices transmembranaires, en violet la boucle luminale, en vert les 4 cystéines du site actif et en gris la membrane du réticulum endoplasmique.

La VKORC1 est relativement conservée entre les espèces et de nombreux orthologues sont retrouvés aussi bien chez les vertébrés, les insectes, les plantes ou encore les bactéries (Goodstadt and Ponting, 2004). Ces séquences orthologues font toutes apparaître des acides aminés strictement conservés ainsi qu'un motif CXXC (Cys132XXCys135) qui constitue le site actif de l'enzyme en formant le centre d'oxydoréduction (Rost et al., 2005). Les anticoagulants antivitamines K comme la warfarine ou la bromadiolone en se fixant sur les sites actifs viennent inhiber VKORC1.

La VKORC1 est l'enzyme clef du cycle de la vitamine K en permettant de régénérer cette vitamine. L'extinction du gène VKORC1 chez la souris entraîne la mort par hémorragie de 50% des individus entre la première et la 3ème semaine. Seule une forte injection quotidienne de PK permet de prévenir cette mortalité. Après 2 jours d'arrêt du traitement, le niveau d'activité des facteurs de coagulation devient indétectable et les animaux meurent, là encore, d'hémorragies.

2.1.5.5.2.2 Mécanisme catalytique

Un mécanisme réactionnel de la réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone a été proposé pour la première fois par Silverman en 1981 (Silverman, 1981). Dans la forme oxydée de VKORC1 les cystéines 132 et 135 forment un pont disulfure (figure 10).

La première étape consiste à l'activation de l'enzyme via la réduction du pont disulfure par l'action d'une protéine non encore identifiée *in vivo*. *In vitro* cette étape peut être réalisée par un agent réducteur fort comme le dithiolthreitol (DTT) (1). La vitamine K-2,3-époxyde se fixe sur l'enzyme et l'atome d'oxygène de l'époxyde est alors protoné (2). Dans le même temps, le thiol d'une des 2 cystéines du site actif forme ainsi un adduit covalent par attaque nucléophile sur le carbone 2 de l'époxyde (3). Le deuxième acide aminé partenaire permet la formation de deux équilibres successifs (4) et (5) pour protoner l'hydroxyle de la vitamine K. Le pont disulfure de VKORC1 en se régénérant conduit au départ d'une molécule d'eau et à la libération de la vitamine K sous sa forme quinone (6).

Ce modèle de mécanisme réactionnel est le seul qui ait été proposé depuis la découverte de VKORC1, mais aucune étude expérimentale n'a permis de le confirmer à ce jour.

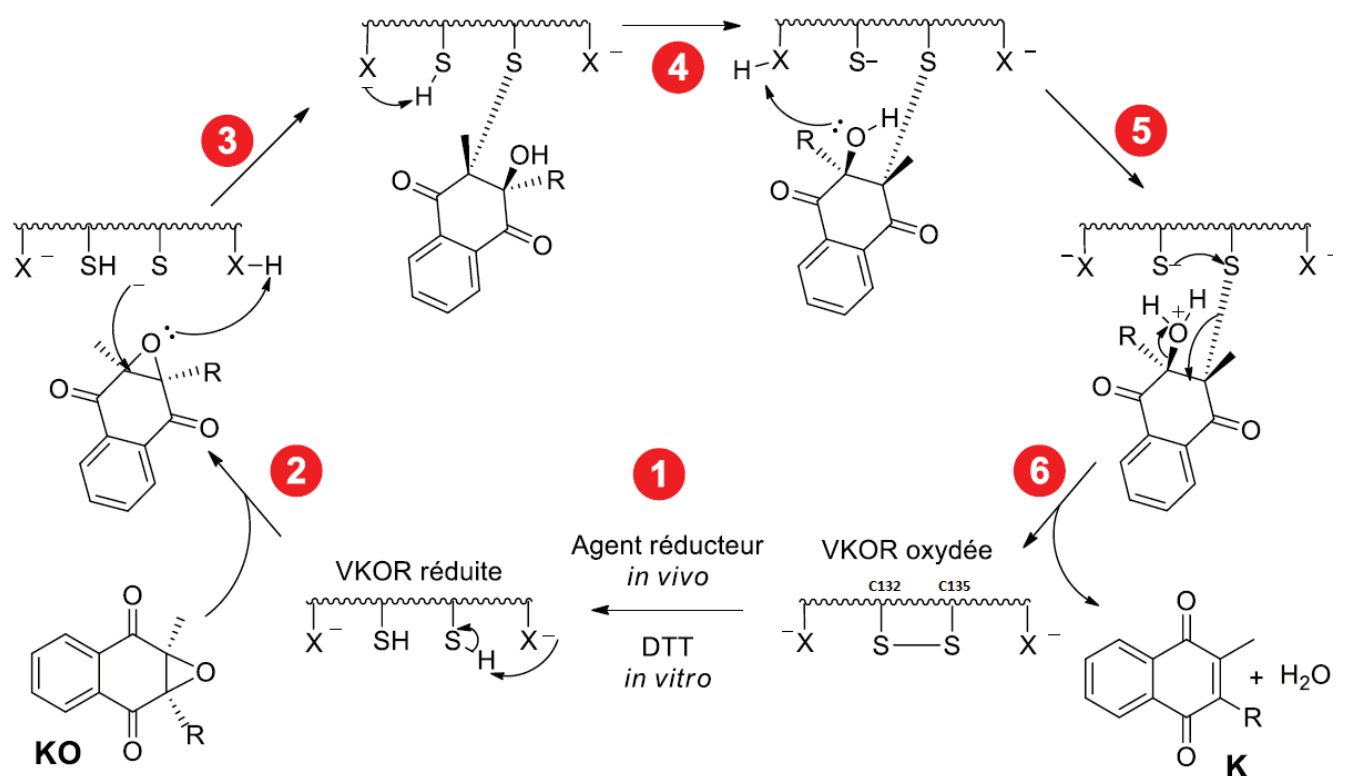


Figure 10 : Mécanisme catalytique de VKORC1. Adapté de « Chemical model studies for the mechanism of vitamin K epoxide reductase » (Silverman, 1981).

2.1.5.5.2.3 Mutations du gène VKORC1 chez le rat

De nombreux polymorphismes du gène VKORC1 ont été rapportés chez *rattus rattus* et *rattus norvegicus*. La majorité de ces mutations est associée à un phénotype de résistance aux AVK chez ces rongeurs ce qui leur procure un avantage sélectif dans les zones traitées aux rodenticides. En Europe un fort polymorphisme du gène VKORC1 a été mis en évidence chez *rattus norvegicus* avec les 5 mutations Y139C, Y139F, Y139S, L128Q et L120Q (Pelz et al., 2005) (Rost et al., 2009) (figure 11).

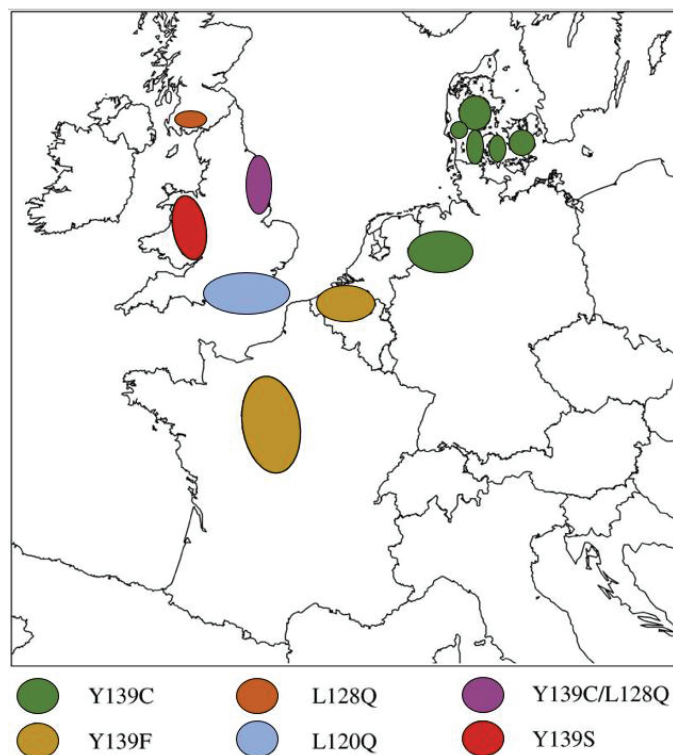


Figure 11 : Répartition des différents polymorphismes de VKORC1 chez *Rattus norvegicus*. D'après « The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. » (Pelz et al., 2005).

Dans le cas de la mutation Y139C, Y139F et Y139S une cystéine, une phénylalanine et une sérine remplacent respectivement la tyrosine en position 139 sur la séquence protéique de VKORC1. Dans la mutation L120Q, la leucine est remplacée par une glutamine. Deux souches de rats sont porteuses de cette mutation. La souche Hampshire et Berkshire. Le nom de ces souches fait référence à la région d'Angleterre où elles ont été initialement identifiées. Bien que porteuse de la même mutation, la souche Berkshire est plus résistante aux AVK que la souche Hampshire (Boitet et al., 2017). La cause de cette plus forte résistance n'est pas liée à d'autres mutations sur VKORC1. Elle pourrait être liée à une métabolisation plus rapide des AVK via les cytochromes P450. Des travaux de séquençage des différents SNP (single

nucleotide polymorphisme) sont actuellement en cours pour essayer d'identifier ce nouveau gène de résistance.

Ces mutations entraînent une modification des constantes catalytiques de VKORC1. L'enzyme est moins efficace pour recycler la vitamine K et des métabolites inactifs sous forme de 2-hydroxyvitamine K et 3-hydroxyvitamine K sont produits in vitro (Matagrín et al., 2013). Cela se traduit chez les rats par des besoins en vitamine K plus importants dans l'alimentation.

C'est ce coût biologique induit par la mutation, notamment chez le rat Y139C, qui est à l'origine du modèle de carence en vitamine K et de calcifications vasculaires qui a été caractérisé au cours de ce travail de thèse.

2.1.5.5.3 VKORC1L1

Dans l'article de Rost en 2004 identifiant le gène *VKORC1*, un alignement de séquences nucléotidiques a été réalisé sur *VKORC1* et a permis d'identifier un gène paralogue à la fois chez l'Homme, la souris, le rat et le poisson *fugu ribrieipes* (Rost et al., 2004b). Ce gène nommé *VKORC1L1* pour VKORC1-like 1 comprend environ 50% d'homologie avec *VKORC1* et présente des motifs similaires à ceux retrouvés dans *VKORC1*. Ainsi, on retrouve un motif CXXC identifié comme site catalytique de *VKORC1*, les cystéines 43 et 51 impliquées dans le transfert du pouvoir réducteur et la tyrosine 139 identifiée comme jouant un rôle majeur dans l'interaction avec les anticoagulants.

VKORC1L1 est très conservée entre les espèces et présente 100% d'homologie entre le rat et la souris et 97% d'homologie entre l'Homme et rat/souris. Une analyse phylogénétique montre que *VKORC1L1* est présent chez les mammifères, mais aussi chez d'autres espèces et possède avec *VKORC1* le même ancêtre commun (Bevans et al., 2015) (Oldenburg et al., 2015).

Le gène de *VKORC1L1* est situé sur le chromosome 7 chez l'Homme et 8 chez le rat et code pour une protéine du même nom de 176 acides aminés. Comme pour *VKORC1* c'est une protéine membranaire du réticulum endoplasmique comportant 4 hélices et une extrémité C-term et N-term au niveau du cytoplasme (*figure 12*). Cette topologie est proposée à partir de celle de la *VKORC1* proposée par Li en 2010, mais aucune structure cristallographique n'a pour l'instant pu confirmer ces résultats.

Plusieurs SNPs ont été identifiées au niveau du gène *VKORC1L1* chez des patients traités à la warfarine. Ces SNPs ne sont cependant pas associées à un phénotype de résistance à la warfarine comme cela a pu être décrit pour *VKORC1*.

VKORC1L1 est capable d'assurer l'activité VKOR en réduisant la vitamine K et ainsi participer aussi au recyclage de cette vitamine. Cette activité VKOR médiée par *VKORC1L1* semble 2,2 et 7,3 fois plus faibles pour la PK et la MK4 que *VKORC1* bien qu'une étude menée par l'équipe de Stafford ne montre pas de différence significative entre les 2 enzymes. Ces conclusions contradictoires semblent être imputables à des approches méthodologiques différentes dans les modèles d'expression enzymatique.

L'enzyme *VKORC1L1* obtenue à partir de microsomes de levures recombinantes *Pichia pastoris* montre une sensibilité à la warfarine 30 à 50 fois moins importante que *VKORC1*. Des données in vivo chez la souris KO pour *VKORC1* montrent que *VKORC1L1* n'est pas capable à elle seule d'assurer le recyclage de la vitamine K. Les souris KO pour *VKORC1* montrent un phénotype hémorragique létal en l'absence d'apport en vitamine K. De plus, ces souris ne montrent pas un plus fort taux d'expression de *VKORC1L1* montrant ainsi l'absence de compensation de *VKORC1L1* induite par le KO de *VKORC1*. En partant de ces constatations Westhofen propose que le rôle principal de *VKORC1L1* ne soit pas de recycler la vitamine K, mais d'agir pour une autre fonction métabolique (Westhofen et al., 2011). En induisant un stress oxydatif par l'ajout de 5,5 μM d' H_2O_2 sur des cellules HEK en culture, l'activité VKOR augmente d'un facteur 5,5. Cette augmentation est accompagnée d'une sur expression des transcrits de *VKORC1L1* et d'une diminution de ceux de *VKORC1*. *VKORC1L1* en produisant préférentiellement de la KH_2 à partir de la KH jouerait ainsi un rôle important dans la régulation du stress oxydatif.

La distribution tissulaire de *VKORC1* et *VKORC1L1* est ubiquitaire, mais l'analyse des taux de transcrits dans les différents tissus montre des différences notables. Ainsi *VKORC1* est fortement exprimé dans le foie et *VKORC1L1* va être plus fortement exprimé dans le cerveau ou encore dans les testicules. Ces niveaux d'expression différents entre les différents tissus peuvent laisser à penser à un métabolisme de la vitamine K et à une réaction aux anticoagulants qui soient tissus spécifiques.

Malgré toutes ces données, les rôles physiologiques de *VKORC1L1* restent encore mal connus. En trouvant un inhibiteur spécifique de *VKORC1L1* ou en créant un KO du gène, il serait alors possible de mieux comprendre ses différentes implications dans le métabolisme de la vitamine K et dans la régulation du stress oxydatif.

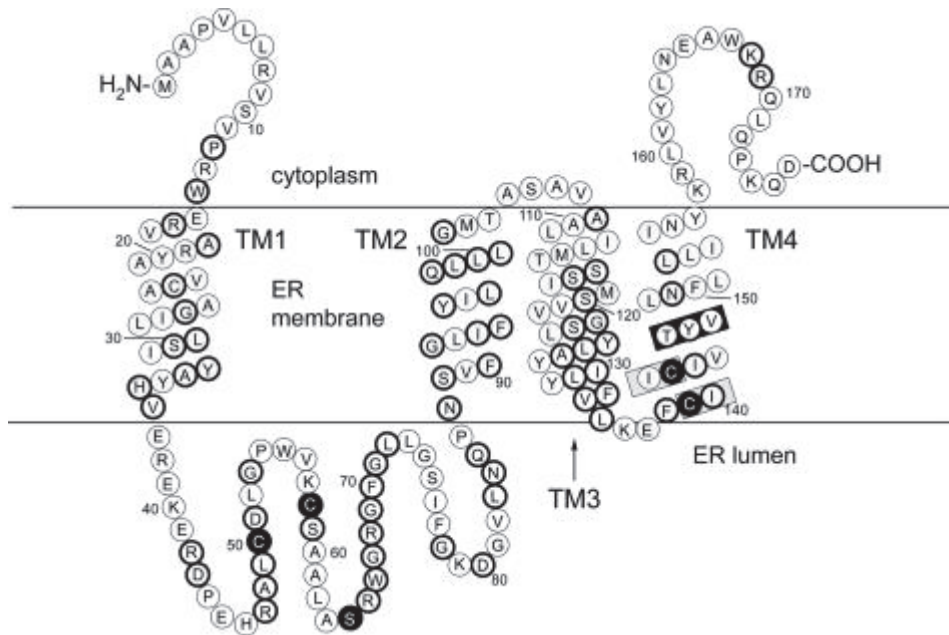


Figure 12 : Topologie de VKORC1L1. D'après « VKORC1 and VKORC1L1: Why do Vertebrates Have Two Vitamin K 2,3-Epoxyde Reductases? » (Oldenburg et al., 2015b).

2.1.5.5.4 Partenaires réducteurs

Pour assurer la réduction de la vitamine K, VKORC1 est dans un premier temps activé par la réduction du pont disulfure entre ses cystéines 132 et 135. Cette étape in vitro peut être réalisée par ajout de DTT dans le milieu réactionnel. In vivo le(s) partenaire(s) protéique responsable de cette activation n'est pas encore identifié. Un candidat appartenant à la super famille protéique des Thioredoxin-like pourrait cependant interagir avec VKORC1 en transférant son pouvoir réducteur sur les résidus cystéines 43 et 51 avant de le transférer à son tour vers les cystéines du site actif.

D'autres partenaires protéiques comme PDI et TMX3 ou encore TMX4 et ERP18 montrent une interaction avec VKORC1. Les conditions expérimentales de ces études sont particulières et nécessitent souvent la présence de DTT dans le milieu réactionnel. De plus l'équipe de Stafford s'oppose au rôle des cystéines 43 et 51 dans ces mécanismes. Beaucoup d'incertitudes subsistent donc à ce jour et de nouvelles études sont nécessaires pour identifier les partenaires protéiques in vivo de VKORC1 et VKORC1L1.

2.1.5.6 Stockage

Le foie est le premier organe à capter la vitamine K d'origine alimentaire. Sa composition est donc fortement dépendante de cet apport et de la demi-vie de la PK et des MK. Pour ces raisons il est difficile de proposer un profil de répartition type des différentes vitamines K au niveau hépatique. Ce profil aussi bien chez le rat que chez l'Homme sera sous l'influence directe de la teneur en vitamine K du dernier repas, de l'âge, du sexe, du microbiote intestinal, de l'état de santé de l'individu, ou encore de variants génétiques (Hodges et al., 1990).

De manière générale, les MK à longues chaînes comme la MK7 ou MK9 ont une demi-vie hépatique plus longue que la PK (10h-15h chez le rat) ou MK-4. La MD (absente en nutrition humaine) a une demi-vie très courte.

Chez le rat si la source de vitamine K dans l'alimentation est sous forme de PK, cette forme sera retrouvée dans le foie. Si la source de vitamine K dans l'alimentation est sous forme de MD comme cela est régulièrement le cas dans les formulations pour rongeurs de laboratoires, la PK sera alors absente au niveau tissulaire.

Chez l'Homme la PK ne représenterait que 10% des « réserves » de vitamine K hépatique pour une concentration de 10 pmol/g de tissus frais (Thijssen and Driittij-Reijnders, 1996). Les 90% restant sont occupés par les MK à longue chaîne et notamment la MK7, MK8, MK10 et MK11.

La concentration plasmatique de PK chez un individu à jeun en bonne santé est de l'ordre de 0,5 nM. À titre de comparaison cela représente une concentration 1, 2 et 3, fois plus faible que la concentration en 25-hydroxyvitamin D, rétinol et alpha-tocophérol.

Comme pour le foie la distribution en vitamine K plasmatique est sous la dépendance du profil alimentaire en vitamine K. L'administration de MK4, PK ou MD radiomarquée à des volontaires sains a permis de mieux comprendre la distribution tissulaire de la vitamine K (Olson et al., 2002). Ces études montrent que la vitamine K est retrouvée en dehors du foie avec une forte concentration dans les glandes androgéniques, les poumons, la moelle osseuse ou encore les reins. La PK est la MK4 sont les formes majoritairement retrouvées en dehors du foie chez le rat (Thijssen and Driittij-Reijnders, 1994), (Thijssen et al., 1996) et chez l'Homme (Thijssen and Driittij-Reijnders, 1996).

Contrairement à la PK, la MK4 se retrouve dans tous les organes même en cas d'absence dans l'alimentation. Cela est possible grâce à la synthèse de novo de la MK4 à partir de la ménadione ou de la PK par UBIAD1. La MK4 peut donc être considérée comme la forme de stockage extrahépatique de la vitamine K chez les mammifères.

D'un point de vue cellulaire, La PK est retrouvée dans toutes les fractions des hépatocytes. La fraction microsomale est la plus riche avec 50% de la PK suivi par la fraction mitochondriale (Konishi and Bara, 1973). Peu d'information est disponible sur les MK et sur les autres cellules, mais il semblerait que la MK9 soit localisée préférentiellement dans la fraction mitochondriale.

2.1.5.7 Catabolisme et élimination

La PK comme les MK sont métabolisées dans le foie par une voie de dégradation commune à l'alpha-tocophérol (Farley et al., 2013). Cette dégradation et élimination s'effectue en 3 temps (*figure 13*).

1) La PK et les MK sont ω -hydroxylées par les cytochromes P450 (CYP4F2 et CYP4F11 chez l'Homme) (Edson et al., 2013) (McDonald et al., 2009).

2) La chaîne latérale poly-isoprénylée est raccourcie par une réaction de bêta-oxydation probablement au niveau des mitochondries. Cela expliquerait pourquoi la vitamine K est retrouvée au niveau de cette fraction cellulaire juste après le réticulum endoplasmique. La bêta-oxydation aboutit à la formation de 2 métabolites ; les acides 5-C et 7-C aglycones.

3) Ces métabolites sont ensuite excrétés dans la bile puis dans les urines sous forme glucuronides (Harrington et al., 2007) (Harrington et al., 2005). Il est estimé que 40% de l'apport quotidien est excrété au par le selles et 20% par les urines (Shearer et al., 1974).

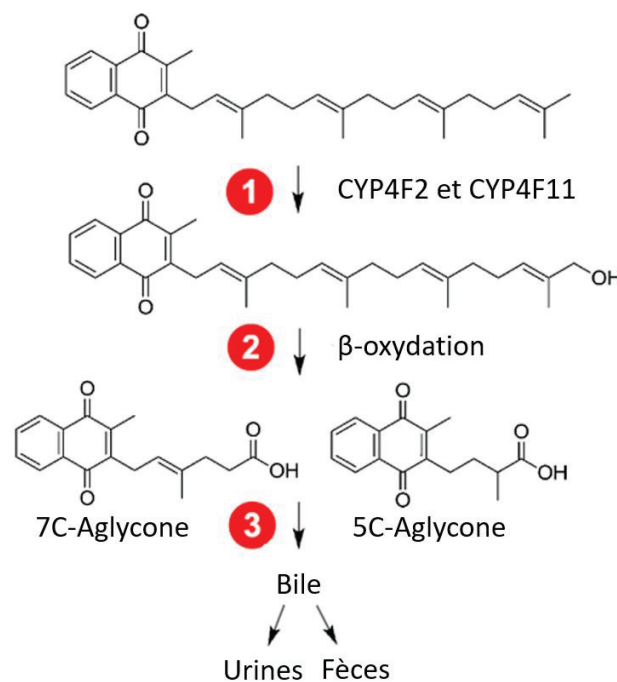


Figure 13 : Catabolisme de la vitamine K.

2.1.6 La carence en vitamines K

2.1.6.1 Chez l'homme

Les besoins alimentaires en vitamine K sont si faibles et le recyclage si efficace qu'il est impossible d'observer en dehors de certaines études les effets d'une carence à court terme pour cette vitamine chez l'Homme. Des rares cas de carences en vitamine K sont rapportés dans le cadre d'une mauvaise absorption intestinale des lipides ou plus fréquemment dans le cadre d'un traitement aux antibiotiques.

Une étude menée par Usui et al en 1990 s'est posée la question de l'impact d'une carence sévère en vitamine K sur les stocks tissulaires pour cette vitamine (Usui et al., 1990). Avant de subir une chirurgie gastro-intestinale, certains patients ont reçu une alimentation pauvre en PK (5µg/jour) pendant 3 jours et d'autres une alimentation standard (150-450 µg/j). Au moment de la chirurgie un prélèvement de foie a été opéré pour ces 2 groupes et il a été montré une baisse 75% de la teneur en PK hépatique chez le groupe sans PK comparativement au groupe standard. Ni le temps de coagulation ni les concentrations en MK à longues chaînes comme la MK7 n'ont été impactées par les 3 jours de carence. Cette étude montre que les réserves hépatiques en PK sont très labiles et fortement déplétées après quelques jours de carence, mais pas pour les MK.

Plusieurs autres études se sont intéressées à l'effet d'une déplétion-réplétion alimentaire en PK chez l'Homme. Les métabolites urinaires de la vitamine K diminuent de manière constante même après 1 mois de restriction ce qui semble indiquer qu'il existe une réserve extrahépatique qui possède un faible turn-over et qui peut être mobilisée.

Dans certaines études utilisant des régimes plus restrictifs, plus longs et utilisant des antibiotiques il est possible d'augmenter l'état de carence et d'induire une diminution des facteurs II, VII et X de la coagulation. Cela se traduit par une légère augmentation du temps de quick. Toutes ces données confirment bien la difficulté à induire chez l'Homme un état de carence en vitamine K.

Une théorie de triage de la vitamine K a été énoncée (McCann and Ames, 2009). Selon l'auteur, l'organisme privilégiera toujours, par un mécanisme encore inconnu, l'utilisation de la vitamine K pour le maintien des fonctions vitales comme la coagulation avant de la rendre disponible pour les fonctions secondaires comme celle de l'inhibition des calcifications vasculaires.

À défaut d'une carence aiguë en vitamine K il pourrait alors exister un état de subcarence chronique dans certaines couches de la population et notamment la population vieillissante. Chez l'Homme une étude prospective sur le long terme n'est pas envisageable pour étudier ce phénomène. Pour pouvoir étudier ces phénomènes, il est possible d'utiliser une approche faisant appel à l'utilisation de modèles animaux comme le rat. C'est de cette approche qu'il est question dans ce travail de thèse.

2.1.6.2 Chez le rat

En 1959, Metta et al décrivent pour la première fois les syndromes hémorragiques provoqués par une carence en vitamine K chez le rat. Cette carence est obtenue par une forte irradiation du bœuf (2,79 à 5,58 millions de rad) qui est incorporé à la nourriture (Metta et al., 1959). Le premier rat est mort au bout de 11 jours et a commencé à montrer des signes de prostration à 8 jours. Son sang ne coagulait plus et des hémorragies au niveau de l'épididyme et du thorax ont aussi été rapportées. Dans cette étude 14 mâles sur 20 sont morts en 46 jours et seulement 1 femelle sur 20 en 80 jours.

À cette époque on pensait que le rat n'avait pas besoin de vitamine K dans son alimentation, car la production par les bactéries intestinales était suffisante. L'ajout de 3µg de sel de ménadione par voie orale a permis de prévenir la mort chez les rats mâles alimentés avec une nourriture irradiée ainsi qu'un retour à la normale du temps de prothrombine. Un an plus tard Metta et al ont essayé d'expliquer la différence de mortalité entre les mâles et les femelles observée dans l'article précédent. La conclusion de cette étude est que cette plus faible mortalité observée chez la femelle n'est ni affectée par la prévention de la coprophagie ni due à une moins grande consommation de nourriture que les mâles pour leur croissance, mais qu'elle est simplement attribuable au sexe (via les hormones sexuelles). Cette hypothèse est supportée par le rapport de Mellette et al en 1960 qui montre que la castration ou l'administration de stilbestrol (mais pas la testostérone) prévient la mort liée à la carence en vitamine K chez le rat mâle (Mellette and Leone, 1960).

Le rat est un animal coprophage qui peut trouver un apport en vitamines et autres nutriments dans son alimentation par cette voie-là. Ce comportement alimentaire joue un rôle qui ne doit pas être négligé lorsque l'on s'intéresse à l'étude d'une carence alimentaire en vitamine K chez cet animal.

Pour limiter la coprophagie, il faudrait empêcher que le rat puisse avoir un accès direct aux fèces et l'utilisation de cages avec des grilles surélevées n'est pas une méthode efficace. Le

seul moyen est de maintenir l'animal dans une certaine contention afin qu'il ne puisse pas se retourner. Cela n'est pas envisageable pour une étude longue de plusieurs semaines pour des raisons de bien-être animal.

2.2 Les protéines vitamines K dépendantes (PVKD)

2.2.1 Généralités

Les PVKD représentent à ce jour un groupe de 14 molécules que l'on peut classer en 2 familles. Les PVKD hépatiques qui sont principalement impliquées dans la coagulation sanguine, et les PVKD extrahépatiques qui interviennent dans d'autres mécanismes de régulations comme l'équilibre ostéocalcique, le métabolisme énergétique ou encore la prolifération cellulaire (*tableau 5*). Ces PVKD nécessitent toutes la présence de vitamine K pour permettre la γ -carboxylation d'un ou plusieurs de leurs résidus glutamates. Ces résidus γ -carboxy-glutamates possèdent une forte affinité pour le calcium ce qui va permettre de conférer aux PVKD leurs activités biologiques.

Tableau 5 : Les différentes protéines vitamines K dépendantes, leurs rôles et leurs distributions tissulaires.

Protéine vitamine K dépendante	Synthèse	Fonctions
Facteur II (Prothrombine)	Hépatocytes	Procoagulant
Facteur VII (proconvertine)		Procoagulant
Facteur IX (facteur antihémophilique B)		Procoagulant
Facteur X (facteur de Stuart-Prower)		Procoagulant
Protéine C		Anticoagulant
Protéine Z		Anticoagulant
Protéine S	Hépatocytes et cellules endothéliales	Anticoagulant
Ostéocalcine	Ostéoblastes, Odontoblastes,	Régulateur négatif de la croissance osseuse, Régulation de la glycémie
Protéine matricielle Gla (MGP)	Cellules musculaires lisses, fibroblastes, Chondrocytes, cellules endothéliales	Inhibiteur de minéralisations vasculaires
Gas 6		Différenciation, prolifération, adhésion cellulaire.
Protéine transmembranaire Gla		Inconnu
Gla-rich protéine (GRP)	Ostéoblastes, Ostéocytes,	Régulation du calcium extracellulaire
Périostine		Migration cellulaire et angiogénèse
Transthyrétine		Ligand des hormones thyroïdiennes et des protéines liées au rétinol

2.2.2 Les PKVD procoagulantes (Facteur II, VII, IX et X)

Les facteurs II, VII, IX et X encore appelés respectivement prothrombine, proconvertine, facteur antihémophilique B et facteur de Stuart-Prower sont synthétisés par les hépatocytes sous forme de zymogènes. Ce sont des protéines d'environ 50 kDa pour les facteurs VII (254 AA), IX (461 AA), X (488 AA) et de 70kDa pour le facteur II (618 AA). On les retrouve sous forme d'hétérodimères constitués d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde reliées entre elles par un pont disulfure. Elles possèdent une demi-vie variable allant de 4h pour le facteur VII à 40-45h pour le facteur X.

Leur activation passe par des modifications post traductionnelles dont la plus essentielle est la γ -carboxylation de leurs résidus Glu. Cela va leur permettre de se lier par des liaisons calcium-dépendant aux groupements phosphates des phosphatidyls sérines présentes à la surface de l'agrégat plaquettaire. Ces 4 PVKD contrôlent les dernières étapes de la formation de fibrine ce qui termine la cascade de la coagulation. Les différentes étapes cette cascade de la coagulation seront détaillées dans la section (2.4.3) de ce manuscrit.

Des mutations au niveau des gènes codant pour ces protéines sont responsables de maladies génétiques rares entraînant d'importants troubles de la coagulation. Ces facteurs sous leur forme activée sont diminués au cours d'une carence en vitamine K ou au cours d'un traitement aux AVK et précèdent l'augmentation du temps de coagulation et les premiers signes cliniques.

Le dosage de ces différentes protéines au niveau plasmatique est un bon indicateur du degré d'intoxication aux AVK ou de carence en vitamine K. Chez le rat, les facteurs de la coagulation ne sont retrouvés dans la circulation sanguine que sous leur forme gamma-carboxylée (Gla) et non sous leur forme non-gamma-carboxylé (Glu) même lors de carences en vitamine K ou de traitements aux AVKs contrairement à l'Homme où les 2 formes coexistent.

2.2.3 Les PVKD anticoagulantes (Protéine C, S et Z)

La protéine C est une peptidase inhibitrice de la coagulation qui nécessite la protéine S comme cofacteur. Les protéines C et S sont des protéines plasmatiques synthétisées par le foie et elles jouent un rôle clef dans la fibrinolyse (*cf section 8.4.4*). Un déficit en protéine C ou son inefficacité à inactiver le facteur V est responsable d'une hypercoagulabilité. Cette dernière est connue sous le nom de facteur V de Leiden.

La protéine Z est une glycoprotéine de 62 kDa elle aussi d'origine hépatique. Elle joue un rôle dans la coagulation en étant un cofacteur de l'enzyme responsable de l'inhibition du facteur Xa.

2.2.4 Protéine matricielle GLA (MGP)

La protéine matricielle Gla ou MGP pour « matrix-gla-protein » a été isolée à partir matrice osseuse bovine et décrite pour la première fois par Paul Price en 1983 (Price et al., 1983). C'est une PVKD de 14 kDa pour 84 acides aminés comportant 5 acides glutamiques en position 2, 37, 41,48, et 52 qui peuvent être γ -carboxylés (Viegas et al., 2009) et 3 sérines phosphorylables en position 3, 6 et 9.

La MGP est exprimée dans les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les chondrocytes, les cellules endothéliales, mais pas au niveau des ostéoblastes. Elle joue un rôle primordial dans l'inhibition des minéralisations vasculaires.

Chez l'Homme, une mutation récessive au niveau du gène codant pour la MGP est responsable du syndrome de Keutel. Ce syndrome se caractérise par une atteinte squelettique (calcifications du cartilage, hypoplasie...) et cardiovasculaire avec d'importantes calcifications artérielles. Chez la souris un KO de la *MGP* entraîne des minéralisations vasculaires massives aboutissant à la mort de l'animal en moins de 2 mois (Luo et al., 1997). Inversement, une hypominéralisation des dents chez la souris surexprimant la MGP a été observée (Kaipatur et al., 2008). Seule la forme γ -carboxylée de la MGP est capable de jouer le rôle d'inhibiteur de calcifications (Proudfoot and Shanahan, 2006) en se liant directement au niveau des cristaux d'hydroxyapatite en formation empêchant ainsi la croissance du cristal et/ou en se liant à BMP-2 (Zebboudj et al., 2003).

2.2.5 Ostéocalcine (OC)

L'ostéocalcine (OC) aussi appelée Bone Gla Protein (BGP) a été identifiée pour la première fois en 1975 par Hauschka à partir de tissus osseux (Hauschka et al., 1975). Cette protéine non collagénique de 49 acides est la plus abondante de la matrice osseuse. Les résidus Glu en position 13,17, 20 chez la souris et 17, 21, 24 chez l'Homme peuvent être γ -carboxylés au niveau du RE. La γ -carboxylation de l'ostéocalcine lui procure une forte affinité pour les ions

calcium de l'hydroxyapatite de l'os (Berkner and Runge, 2004) (Sunnerhagen et al., 1996). Pendant la phase de remodelage osseux, la diminution du pH au dans les lacunes des ostéoclastes favorise la décarboxylation de l'ostéocalcine (passant de la forme cOC à ucOC). Cela réduit son affinité pour l'os et favorise son relargage dans la circulation générale (Malashkevich et al., 2013).

La forte présence de l'ostéocalcine dans la matrice osseuse a d'abord laissé supposer un rôle majeur dans la régulation de sa minéralisation. Ce rôle a été confirmé chez des souris KO pour le gène codant pour l'ostéocalcine en montrant une augmentation de la minéralisation osseuse chez ces animaux (Ducy et al., 1996). De manière intéressante ces souris présentaient aussi une diminution de la taille des îlots de Langerhans, une hypoinsulinémie, une hyperglycémie, une diminution de l'expression et de la concentration plasmatique de l'adiponectine ainsi qu'une augmentation de la masse grasse (Lee et al., 2007). Ces résultats ont permis de mettre en évidence le rôle de l'ostéocalcine comme régulateur du métabolisme énergétique.

In vitro, l'ajout d'OC à des cellules β du pancréas en culture stimule l'expression de l'insuline (Hinoi et al., 2008). Ces résultats sont confirmés *in vivo* en montrant que l'administration d'ostéocalcine au long court chez la souris augmente la stimulation de la sécrétion de l'insuline ainsi que la tolérance au glucose (Ferron et al., 2008). Ces études montrent pour la première fois un rôle endocrine de l'os sur le métabolisme énergétique par l'ostéocalcine circulante (figure 14).

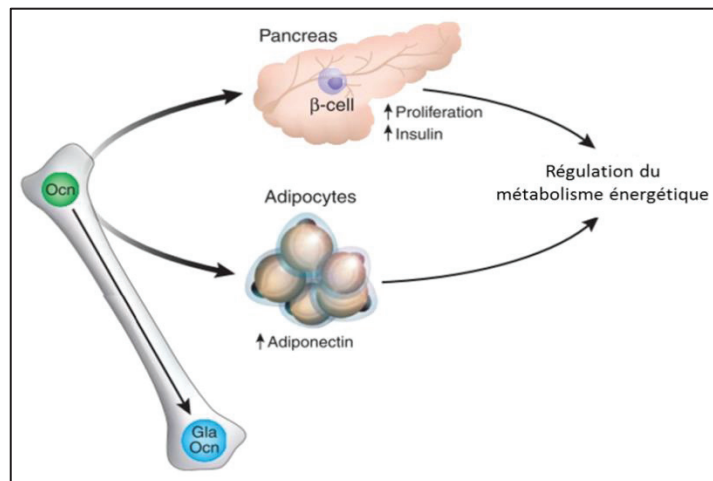


Figure 14 : Rôle de l'os dans le métabolisme énergétique médié par l'ostéocalcine

L'ostéocalcine serait aussi impliquée dans la reproduction en favorisant la fertilité masculine (Oury et al., 2011). D'après ces auteurs, elle stimulerait la synthèse de testostérone dans les testicules en se fixant au niveau de récepteurs spécifiques (Gprc6a) localisés sur la membrane des cellules de Leydig.

2.2.6 Growth arrest specific gene 6 (Gas6)

La protéine « growth arrest specific gene 6 » (Gas6) a été identifiée pour la première fois en 1988 par le Dr Schneider alors que lui et son équipe étaient à la recherche de gènes surexprimés dans des fibroblasts de souris dont la croissance était stoppée à l'état embryonnaire (Schneider et al., 1988).

Gas6 est une glycoprotéine de 75 kDa contenant un domaine Gla dans sa partie N-terminale. Bien que Gas6 partage environ 44% d'homologie de séquence peptidique avec la protéine S, les fonctions de ces 2 protéines restent très différentes (Laurance et al., 2012). Gas6 est impliquée dans la régulation de la prolifération, la différenciation, la migration et l'adhésion cellulaire, mais aussi dans l'agrégation plaquettaire, le relargage de cytokines pro-inflammatoires ou encore le développement des adipocytes. Plus récemment plusieurs études rapportent que Gas6 pourrait jouer un rôle dans l'inflammation, le diabète de type 2 et la résistance à l'insuline (Hung et al., 2010) (Lee et al., 2012) (Hsiao et al., 2013) (Dihingia et al., 2017).

2.2.7 Protéine riche en Gla (GRP)

La Gla-rich-protein (GRP) aussi connue sous le nom de « upper zone of growth plate and cartilage matrix associated protein » (Ucma) est une protéine Gla de 74 acides aminés identifiée pour la première fois en 2008 à partir de cartilage calcifié d'esturgeons (Viegas et al., 2008). Elle comporte entre 16 et 19 résidus Gla en fonction des espèces (15 pour l'Homme) et son expression se fait principalement au niveau du cartilage et plus particulièrement par les chondrocyte quiescents (Surmann-Schmitt et al., 2008). La GRP est aussi retrouvée au niveau de l'os, de la peau ou encore le tissu vasculaire. Comme pour la MGP, la GRP va agir comme inhibiteur de la calcification et s'accumule sous sa forme non γ -carboxylée dans les tissus calcifiés (Viegas et al., 2009).

Il est possible que la GRP fixe les cristaux d'hydroxyapatites sur les résidus Gla. Contrairement aux souris KO pour la MGP, le KO pour la GRP ne permet pas d'observer de phénotype clair de calcification au cours du développement (Eitzinger et al., 2012).

Plus récemment il a été montré que la GRP était surexprimée dans des synoviocytes, chondrocytes, leucocytes et cellules THP-1 lorsque ceux-ci étaient stimulés par des agents pro-inflammatoires comme l'IL1-B ou le LPS (Cavaco et al., 2016) (Viegas et al., 2017). De plus cet état d'inflammation est fortement diminué lorsque la GRP est à son tour surexprimée

et cela, quel que soit son état de γ -carboxylation. Ces données suggèrent fortement que la GRP en plus d'être un inhibiteur de calcification, pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'inflammation comme dans le cas de l'arthrose. Ces auteurs identifient la GRP comme une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt.

2.2.8 Transthyrélines

La transthyréline ou anciennement préalbumine, est une protéine présente en quantité importante dans le plasma et le liquide cérébro-spinal. C'est une protéine homo-tétramérique de 55 kDa synthétisée au dans le foie et le plexus choroïdes. Sous sa forme circulante, elle est capable de se lier aux hormones thyroïdes (Blake and Oatley, 1977), (Blake et al., 1974) ou encore d'interagir avec les protéines fixant le rétinol (Naylor and Newcomer, 1999), (Hörnberg et al., 2000). En 2008 Rüggeberg a montré que la transthyréline pouvait être γ -carboxylée uniquement au niveau du résidu Glu-42 (Hörnberg et al., 2000). C'est la seule protéine γ -carboxylable qui ne possède pas de propeptides et qui ne comporte qu'un seul site de γ -carboxylation.

La forme γ -carboxylée ne se retrouve que dans le liquide cérebrospinal des patients atteints de la maladie de génétique rare Moyamoya. C'est une maladie angiogénique rare liée à une sténose progressive des artères cérébrales situées à la base du cerveau donnant un aspect en « fumée de cigarette » (moya-moya en japonais). La γ -carboxylation de la transthyréline pourrait jouer un rôle important dans le développement de cette pathologie.

2.2.9 Périostine

Le gène de la périostine code pour une protéine du même nom comportant une séquence signal de 22 AA pour une séquence totale de 814 AA et 90kDa et son épissage alternatif produit 3 isoformes.

La périostine est la protéine Gla la plus abondamment sécrétée par les cellules mésenchymateuses stromale de la moelle osseuse. Ces cellules sont des cellules souches différenciables en ostéoblastes, chondrocytes ou adipocytes.

La structure de la périostine fait apparaître 4 domaines fasciclin-like répétés en tandem qui comportent 16 résidus γ -carboxylables (Coutu et al., 2008). Il a été constaté que la périostine est déposée abondamment dans les nodules osseux, dans les zones où les cellules

ostéoblastiques sont étroitement liées dans la matrice extracellulaire minéralisée. Cela suggère que la périostine par ses résidus de Gla pourrait se lier à l'hydroxyapatite lui procurant ainsi un rôle structurel important. La périostine est impliquée dans de nombreuses pathologies et ces relations ont été décrites dans la revue bibliographique de Kudo en 2017 (Kudo, 2017). Un paralogue de la périostine, lui aussi γ -carboxylable, a été identifié sous le nom de β igh3 ce qui en fait à ce jour la 15^{ème} PVDK identifiée.

2.3 Les antivitamines K

2.3.1 Historique

Dans les années 1920 au Canada et au nord des États-Unis certains bovins ont commencé à présenter des syndromes hémorragiques spontanés et fatals. Le vétérinaire F.W Scofield montre deux ans plus tard que ces manifestations sont dues à la consommation de trèfle roux ou de mélilot importés d'Europe. En retirant cet aliment de la ration quotidienne il permet la guérison des animaux. Ce n'est qu'en 1939 que la molécule, la 3,3'-diméthylène-4-hydroxycoumarine, responsable de ces intoxications a été identifiée par Karl Paul Link. La durée d'importation assez longue combinée à une mauvaise conservation de ces aliments est à l'origine de ces intoxications. La coumarine naturellement présente dans les fourrages se transformait par un processus de fermentation en dicoumarol, une molécule anticoagulante. Synthétisée par voie chimique en 1941 et utilisée comme anticoagulant en médecine humaine elle a été rapidement abandonnée au profit du coumafène, un autre AVK comportant aussi un noyau coumarinique. Ce coumafène est encore un AVK largement utilisé en médecine humaine et notamment aux États-Unis sous le nom de warfarine où son faible coût le rend accessible par les personnes présentant une couverture de santé assez limitée.

2.3.2 Les différents anti-vitamines K

Depuis l'isolement du dicoumarol, de nombreuses molécules AVK ont été synthétisées. Toutes ces molécules peuvent être classées en 3 grandes catégories en fonction de leur structure chimique :

- Les dérivés des 4-hydroxycoumarines (*figure 15A*) parmi lesquels on va retrouver le coumafène, le brodifacoum et la bromadiolone.
- Un dérivé de la 4-hydroxy-thiocoumarine (*figure 15B*) représenté par la diféthialone.
- Les dérivés de l'indane-1,3-dione (*figure 15C*) parmi lesquels on va retrouver la fluindione .

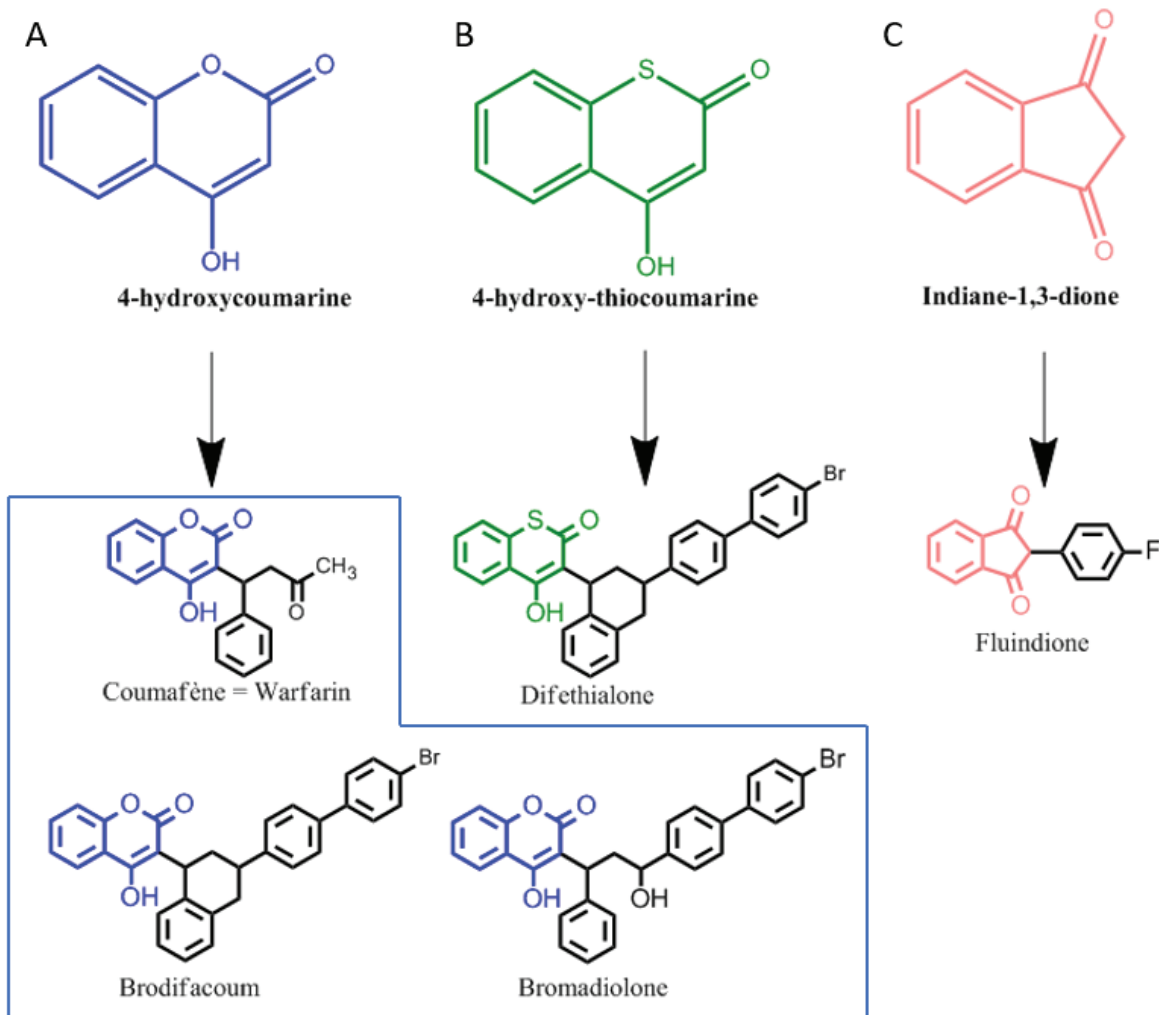


Figure 15 : Les principales familles d'AVK et leurs dérivés. (A) le noyau 4-hydroxycoumarine et le coumafène, brodifacoum et bromadiolone, (B) le noyau 4-hydroxy-thiocoumarine et la diféthialone, (C) le noyau indiane-1,3-dione et la fluideione.

2.3.3 Utilisation des AVK et répercussions

2.3.3.1 Chez les rongeurs

Les AVK sont utilisés dans les appâts rodenticides comme principe actif pour gérer les populations des rongeurs. Les AVK utilisés peuvent être répartis en 2 générations :

- La première qui comprend la warfarine le coumatétralyl et la chlorophacinone a été utilisée depuis les années 1950. L'utilisation à grande échelle de cette première génération a favorisé l'émergence de phénomènes de résistances chez les rongeurs, rendant cette première génération moins efficace.
- Une seconde génération comprenant la bromadiolone, le difénacoum, le brodifacoum, la diféthialone et le flocoumafène est maintenant utilisée et se révèle plus efficace pour

la lutte contre des souches de rongeurs résistants. Cette deuxième génération présente cependant une rémanence plus importante et la consommation directe par les espèces non cibles (intoxication primaire) ou indirecte via les rongeurs intoxiqués est à l'origine d'intoxications secondaires. Ces intoxications secondaires sont responsables de problèmes d'écotoxicologie. Des solutions sont actuellement à l'étude pour maintenir l'efficacité de la 2^{ème} génération tout en diminuant la rémanence associée.

L'utilisation des AVK pour la lutte contre les rongeurs présente 2 avantages principaux :

- 1- Les manifestations cliniques (saignement / hémorragies) se font à retardement. Cela va permettre de provoquer la mort des animaux 3 à 5 jours après la première consommation de l'appât contournant ainsi le phénomène d'aversion alimentaire qui est particulièrement développé chez les rongeurs.
- 2- Il existe un antidote efficace, la PK, en cas d'intoxication accidentelle par l'Homme ou les espèces non cibles. Aucun cas d'intoxication mortelle chez l'Homme, même lors de tentatives de suicides ou de meurtres, n'a été reporté en France depuis plus de 10 ans.

Ces 2 points font des AVK un moyen de lutte sûr et efficace contrairement aux molécules anciennement utilisées comme l'arsenic, la vitamine D à dose toxique, la strychnine ou interdites d'utilisation en Europe comme la brométhaline.

2.3.3.2 Chez l'Homme

Chez l'Homme les AVK dérivés de la 4-hydroxycoumarine comme le coumaphène (Coumadine) et l'acénocoumarol (Sintrom) ou dérivés de l'indane-dione comme la fluindione (Previscan) sont utilisés en prévention des maladies thromboemboliques depuis de nombreuses années. Ces affections présentent une forte prévalence dans les populations vieillissantes et l'utilisation d'AVK au long court est souvent la solution pour ces personnes. L'action décalée des AVK (environ 48h chez l'Homme), une fenêtre thérapeutique étroite et des variations interindividuelles nécessitent cependant un suivi régulier de la coagulation via un examen sanguin : « l'International Normalized Ratio » (INR) afin d'ajuster la dose optimale. Un sous-dosage entraîne l'inefficacité du traitement et un surdosage peut engendrer des hémorragies importantes quelques fois létales.

Dans 80% des cas, ces AVK sont prescrits de manière chronique chez les patients. Plusieurs études montrent que l'utilisation au long cours de ces AVK est associée avec le développement de calcification de la média des parois vasculaires (Tantisattamo et al., 2015), (Weijs et al., 2011), (Schurgers et al., 2012). L'évaluation des conséquences de ces calcifications médiées par l'utilisation des AVK reste cependant faible.

2.3.3.3 Métabolisme des AVK

Les AVK agissent comme inhibiteurs non compétitifs de l'activité VKOR et VKR. La vitamine K ne peut plus se retrouver sous forme hydroquinone et participer en tant que cofacteur de la GGCX. Les AVK diminuent ainsi indirectement la concentration plasmatique des formes Gla des facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants, ce qui a pour conséquence de limiter l'activation de la coagulation. La gamma-carboxylation n'est cependant pas réservée aux protéines de la coagulation, et les autres PVKD, comme la MGP, sont aussi impactées par les AVK.

Les AVK sont métabolisés dans le foie par les cytochromes P450 (CYP). La nature des CYP impliquée dans le métabolisme d'un AVK dépend très fortement de l'AVK considéré. Chez l'Homme, le CYP2C9 est ainsi impliqué dans la 6 ou 7 hydroxylation de la S-warfarine, les cytochromes 2C8, 2C18 et 2C19 étant eux impliqués dans la 4' hydroxylation de cette molécule. Les CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8 et CYP2C19 dans la 6, 7 et 8 hydroxylation de la R-warfarin et le CYP3A4 dans la 10 hydroxylation de la R-warfarine.

Le métabolisme de la R warfarine est plus rapide que celui de la S-warfarine et la S-warfarine contribue à plus de 70% de l'activité de la warfarine racémique. Le facteur limitant du métabolisme de la S-warfarine est le CYP2C9 et différents polymorphismes de ce cytochrome peuvent être responsables d'une modification du métabolisme de coumafène modifiant ainsi sa pharmacocinétique.

Ces polymorphismes lorsqu'ils sont identifiés chez un individu doivent être pris en compte pour adapter au mieux la dose thérapeutique en AVK. Une fois métabolisés par les CYP, les AVK sont excrétés dans les urines sous forme glucuroconjuguée (Ishizuka, 2008).

2.4 La coagulation sanguine

2.4.1 Coagulation sanguine définition et généralités

La coagulation sanguine est un ensemble d'étapes physiologiques permettant d'assurer l'hémostase, c'est-à-dire le maintien du sang dans le système vasculaire. En cas de lésion d'un vaisseau sanguin, la coagulation se met en place rapidement et reste localisée au niveau de la zone lésée pour limiter l'hémorragie et éviter les conséquences associées. Une régulation fine entre les facteurs procoagulants et anticoagulants est nécessaire au maintien de l'hémostase. L'intégralité de l'hémostase est réalisée en 3 étapes qui sont l'hémostase primaire, l'hémostase secondaire et l'hémostase tertiaire.

2.4.2 Hémostase primaire

L'hémostase primaire est la première étape d'urgence du contrôle de l'hémorragie. Elle commence au moment de la lésion pour se terminer par la formation du clou plaquettaire permettant l'obturation de la brèche vasculaire. C'est une étape qui se met en place très rapidement et qui ne dure que 3 à 5 minutes. Elle est composée d'un temps vasculaire et d'un temps plaquettaire.

2.4.2.1 Temps vasculaire

Après un choc ou une coupure, l'endothélium endommagé n'est plus capable d'assurer l'hémostase. La première réponse va être une vasoconstriction passive liée à l'élasticité des parois vasculaires suivie d'une vasoconstriction active grâce à la contraction réflexe des fibres musculaires lisses de la paroi artérielle (*figure 16a*). Cette vasoconstriction permet de diminuer localement le débit sanguin. Il y a aussi augmentation des forces de cisaillement (surtout au niveau des vaisseaux de petits diamètres) ce qui va favoriser le contact des plaquettes non activées avec le sous-endothélium. Certaines protéines du sous-endothélium et des couches plus profondes du vaisseau telles que, le facteur de Willebrand, les différents types de collagènes, la fibronectine ou encore les laminines vont alors interagir avec les plaquettes. La liaison avec le facteur de Willebrand va engendrer une signalisation intracellulaire qui entraîne des changements morphologiques des plaquettes. Ces dernières vont alors émettre des

filopodes et l'activation de certaines intégrines qui vont favoriser leur étalement et leur adhérence au niveau de la paroi lésée.

2.4.2.2 Temps plaquettaire

Les plaquettes vont alors adhérer à la surface du sous-endothélium *via* des récepteurs membranaires spécifiques et par l'intermédiaire du facteur Willebrand (*figure 16b*). Les plaquettes se retrouvent alors sous leur forme activée et vont libérer des substances comme le thromboxane A2 qui vont favoriser davantage le recrutement de nouvelles plaquettes. En présence de calcium et de fibrinogène, les plaquettes vont s'agréger entre elles par le récepteur de la membrane plaquettaire (GPIIb/IIIa) (*figure 16c*). Cet agrégat formé de plaquettes et de fibrine est appelé clou plaquettaire ou encore thrombus blanc et termine l'hémostase primaire (*figure 16d*).

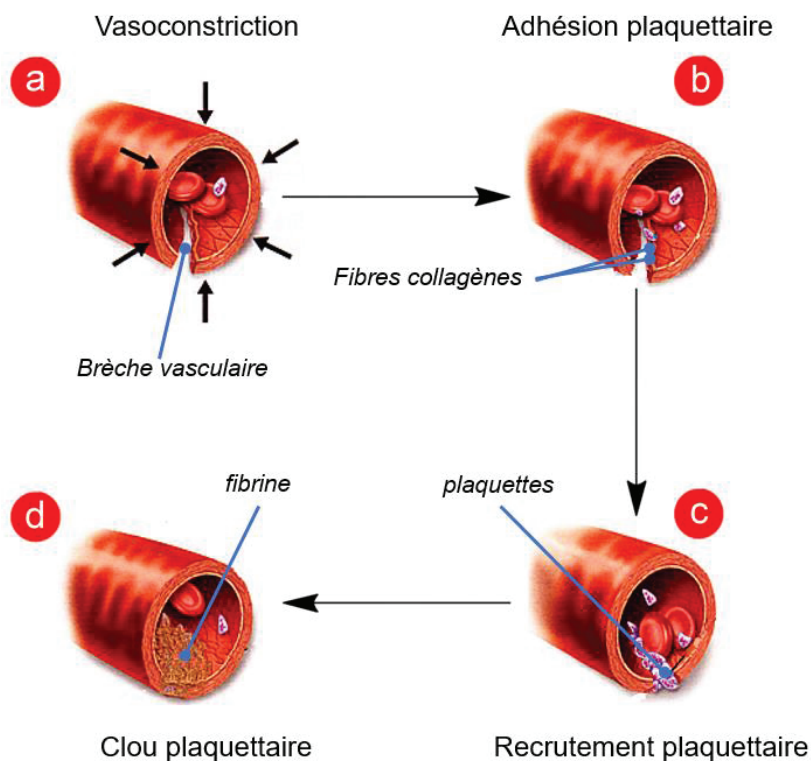


Figure 16 : hémostase primaire.

2.4.3 Hémostase secondaire

L'hémostase secondaire renforce le clou plaquettaire grâce à la production de fibrine et aboutit à la formation d'un caillot insoluble. L'ensemble de ces étapes repose sur l'activation en cascade de plusieurs facteurs de la coagulation (*tableau 6*) dont la dernière étape repose sur la production de fibrine insoluble. L'ensemble de ces étapes forme la cascade de la coagulation qui repose sur l'activation de 2 voies ; la voie endogène et la voie du facteur tissulaire (= ex voie extrinsèque) avant de se retrouver en une seule voie commune (*figure 17*).

Tableau 6 : Les différents facteurs de la coagulation et leurs inhibiteurs.

Facteur / Inhibiteur	Nom	PVKD
I	Fibrinogène	Non
II	Prothrombine	Oui
V	Proaccélélerine	Non
VII	Proconvertine	Oui
VIII	Facteur anti-hémophilique A	Non
IX	Facteur anti-hémophilique B	Oui
X	Facteur de Stuart	Oui
XI	Facteur Rosenthal	Non
XII	Facteur de Hageman	Non
XIII	Facteur stabilisant de la fibrine	Non
PK	Facteur de Fletcher	Non
KHPM	Kininogène de haut poids moléculaire	Non
ATIII	Antithrombine III	Non
PC	Protéine C	Oui
PS	Protéine S	Oui

2.4.3.1 La voie du facteur tissulaire

Le facteur tissulaire ou thromboplastine (facteur III) est présent à la surface des cellules épithéliales et des muqueuses et son expression est augmentée en cas d'inflammation. Le facteur tissulaire va permettre d'initier la voie endogène en activant le facteur VII. Le facteur VII activé (VIIa) va à son tour permettre l'activation du facteur X.

2.4.3.2 La voie endogène

L'activation du facteur XII par contact avec le sous-endothélium (dû à la lésion de l'endothélium) va initier la voie endogène. Le facteur XIIa va activer le facteur XI puis le facteur XIa va à son tour activer le facteur IX. Le facteur IXa en présence de son cofacteur le facteur VIIIa vont permettre d'activer le facteur X.

La voie endogène et celle du facteur tissulaire se retrouvent en une même voie commune au moment de l'activation du facteur X.

2.4.3.3 La voie commune

Le facteur Xa va initier la voie commune en permettant le clivage de la prothrombine en thrombine. La thrombine va à son tour permettre le clivage du fibrinogène en fibrine. Le facteur XIIIa va pouvoir former des ponts ϵ -(γ -glutamyl)lysine avec les polymères de fibrine la rendant ainsi insoluble et terminant la cascade de la coagulation.

Il existe de nombreux rétrocontrôles au sein de cette version simplifiée de la cascade de la coagulation. Par exemple l'antithrombine peut également inhiber le facteur X et la thrombine. La protéine S active la protéine C qui à son tour agit comme inhibiteur du facteur VIII.

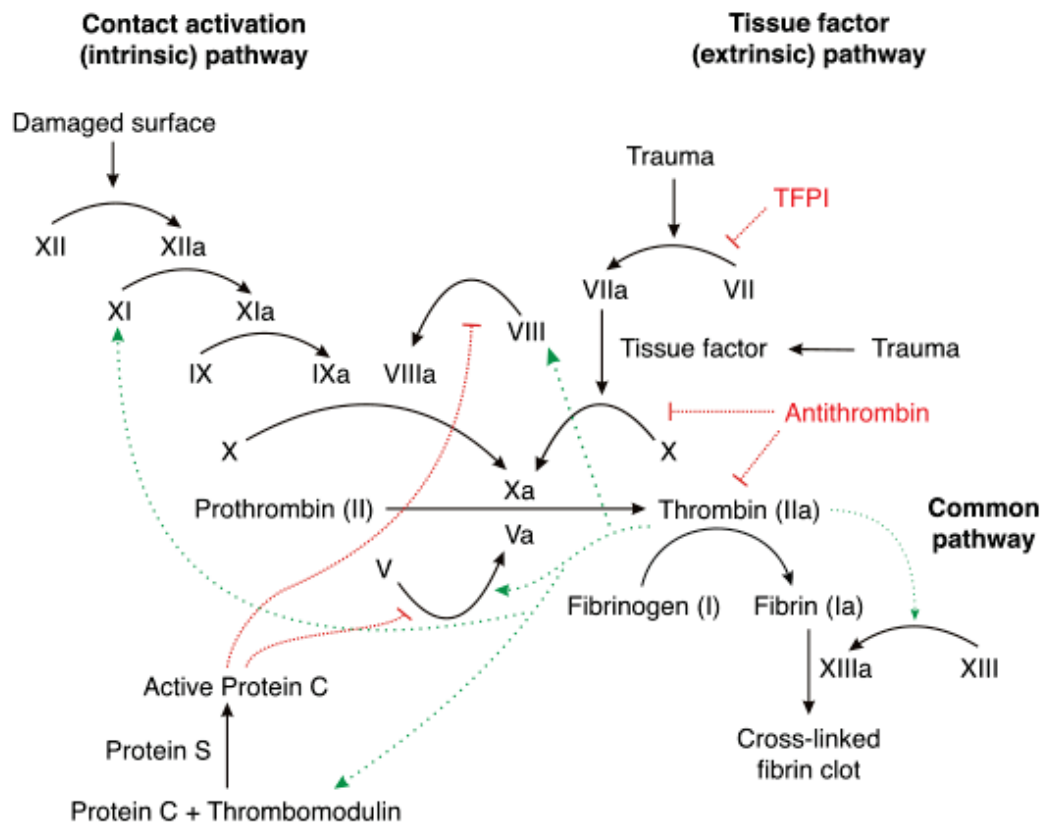


Figure 17 : Version simplifiée de la cascade de la coagulation.

2.4.4 Hémostase tertiaire

L'hémostase tertiaire correspond à la fibrinolyse c'est-à-dire à la résolution du clou plaquettaire. Cette étape est médiée par l'action de l'enzyme protéolytique, la plasmine. En condition normale, la plasmine circule sous sa forme inactive, le plasminogène. Ce plasminogène est une β -globuline synthétisée par le foie et elle se lie grâce à sa forte affinité pour la lysine au fibrinogène et la fibrine, présent au sein du clou plaquettaire. Plusieurs jours après la lésion du vaisseau sanguin, l'endothélium va relarguer des activateurs du plasminogène (tPA, urokinase). Ces activateurs vont diffuser au travers du caillot et cliver le plasminogène en plasmine. La plasmine via son activité sérine protéase va dégrader les polymères de fibrines en produits de dégradation de la fibrine. Après plusieurs étapes de dégradations successives, ces produits de dégradation de la fibrine vont se complexer avec des monomères de fibrines empêchant leur polymérisation par la formation d'un complexe soluble. Les autres produits peptidiques issus de la dégradation par la plasmine vont jouer une action antithrombotique et inhibitrice de l'agrégation plaquettaire. La fibrinolyse va permettre d'éviter d'éventuelles complications thromboemboliques qui seraient dues à l'accumulation

des caillots dans la circulation sanguine. La fibrinolyse est la plus longue des 3 phases de l'hémostase et se met en place plus de 60 heures après la formation du clou plaquettaire.

2.4.5 Exploration de l'hémostase

L'exploration de l'hémostase peut être réalisée à chacune des 3 étapes.

- L'hémostase primaire peut être explorée via l'évaluation du temps de saignement, la numération plaquettaire, l'évaluation de l'agrégation et de la sécrétion plaquettaire ou encore le dosage et la mesure de l'activité du facteur de von Willebrand.
- L'exploration de l'hémostase secondaire peut être réalisée en évaluant le temps de Quick (temps de prothrombine), le temps de céphaline kaolin, le test de génération de thrombine, via la réalisation d'un thromboélastogramme, ou encore via le dosage des facteurs de la coagulation.
- La fibrinolyse peut être étudiée par exploration globale via le test de Von Kaulla, le dosage de plasminogène, le dosage de fibrinogène ou encore le dosage des produits de dégradation de la fibrine et les d-dimères.

L'utilisation d'AVK ou la limitation des apports en vitamine K va directement jouer un rôle sur la coagulation en empêchant l'activation des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants II, VII, IX et X. Ces facteurs à l'exception du facteur IX appartiennent à la voie du facteur tissulaire et à la voie commune de la cascade de la coagulation. Pour évaluer ces différents facteurs, seules les deux techniques exploratoires de l'hémostase utilisées au cours de ce travail de thèse sont détaillées dans la section suivante.

2.4.5.1 Temps de Quick

Le temps de Quick (TQ) ou temps de prothrombine est un test de première intention couramment utilisé qui permet d'explorer la voie du facteur tissulaire de la coagulation. Il correspond au temps nécessaire à un plasma préalablement citraté à coaguler après l'ajout de calcium et de thromboplastine. Le calcium et la thromboplastine vont permettre d'initier la voie du facteur tissulaire en activant le facteur VII.

La mesure du TQ est cependant soumise à d'importantes variations en fonction du lot de thromboplastine utilisé. Cela rend la comparaison intra et inter laboratoires compliquée. Pour répondre à ce biais, chaque lot de thromboplastine est caractérisé par un index de sensibilité international (ISI). Plus l'ISI est faible plus il est sensible. En 1982 la notion d'INR a permis de standardiser la valeur du temps de Quick en prenant en compte l'ISI et de plasmas témoins en référence selon la formule suivante :

$$\text{INR} = (\text{TQ échantillon} / \text{TQ témoin})^{\text{ISI}}$$

L'INR est donc défini comme étant le rapport du TQ de l'échantillon à mesurer sur celui de l'échantillon témoin le tout élevé à la puissance ISI.

La surveillance du traitement aux AVK repose aujourd'hui sur le contrôle de l'INR.

Le TQ reste un bon indicateur de la coagulation s'il est utilisé pour comparer les résultats au sein d'une même étude et qu'un seul lot de thromboplastine a permis de générer tous les résultats.

2.4.5.2 Dosage des facteurs de la coagulation

Il est possible d'évaluer l'efficacité de la coagulation en dosant directement les facteurs de la coagulation activés disponibles et notamment les facteurs vitamines K dépendants. Le principe du dosage est identique pour les 4 facteurs et repose sur la capacité de ces facteurs à cliver un substrat chromogénique après une succession d'étapes. Dans le cas simple du dosage du facteur X il est ajouté au plasma citraté un tampon contenant tous les autres facteurs. Cela permet au facteur X d'être l'étape limitante de la réaction. L'ajout de venin de vipère de Russell va ensuite activer le facteur X qui va alors pouvoir cliver le substrat peptidique du facteur Xa (S_{Xa}). En étant clivé, le S_{Xa} va libérer de la paranitroaniline (pNA) qui est un substrat chromogénique dont la longueur d'onde maximale d'absorption est de 405nm.

Le dosage de la prothrombine est légèrement différent en faisant intervenir de l'écarine qui réagit indifféremment avec la forme gamma-carboxylée et non-gamma-carboxylée de la prothrombine. L'utilisation classique de l'écarine est la mesure de la prothrombine non-gamma-carboxylée présente dans le plasma chez l'homme dans un contexte de carence en vitamine K ou d'utilisation d'AVK. Chez le rat, seule la prothrombine gamma-carboxylée est circulante, la forme non-gamma-carboxylée n'étant pas libérée par l'hépatocyte. L'écarine peut être utilisée pour activer directement la prothrombine.

2.5 Les minéralisations vasculaires

2.5.1 Généralités

Les minéralisations vasculaires ou calcifications vasculaires (CV) peuvent être définies comme le résultat d'un dépôt pathologique d'une matrice osseuse minéralisée au sein du système vasculaire. Ces dépôts sont composés de cristaux d'hydroxyapatites eux même composés de phosphate et de calcium $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Ces cristaux sont les mêmes que ceux retrouvés au cours de la minéralisation osseuse (ossification). Ce dépôt minéral au sein du système cardio-vasculaire fait de ce dernier la 2^{ème} structure minéralisée de l'organisme après le squelette.

La minéralisation vasculaire est une affection fréquente dans la population générale et principalement retrouvée chez les personnes de plus de 60 ans ou elle est associée à un risque cardiovasculaire important (Allison et al., 2004), (Leening et al., 2012), (Rifkin et al., 2012), (Alexopoulos and Raggi, 2009). Cette pathologie est aussi accélérée au cours du diabète, de pathologies inflammatoires, de la maladie rénale chronique, de l'ostéoporose, lors d'un traitement aux AVK au long cours ou encore dans certaines maladies héréditaires (Wu et al., 2013), (McCullough et al., 2008), (Johnson et al., 2006).

Pendant longtemps la minéralisation vasculaire était considérée comme étant un phénomène passif. On lui accorde aujourd'hui une régulation par des mécanismes actifs complexes faisant intervenir des cellules de ressemblant à des ostéoblastes (osteoblast-like) (OST-L). Ces OST-L sont des cellules vasculaires musculaires lisses (VSMC) qui se sont différenciées en cellules comportant des caractéristiques propres aux ostéoblastes comme celle de synthétiser des vésicules matricielles minéralisées dans les parois artérielles (Qiao et al., 2003).

On distingue 4 grands types anatomiques de minéralisations vasculaires ; les minéralisations intimes, médiales, les calcifications valvulaires et la calciphylaxie (*figure 18*). Certaines de ces calcifications peuvent coexister au sein d'un même vaisseau et agir en synergie. C'est le cas des calcifications rencontrées chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique (IRC) qui allient calcifications intimes et médiales. Ces différents types de minéralisations vont toutes être responsables de vasculopathies aux répercussions cliniques diverses. La présence de calcifications vasculaires quelques soit leurs localisations, multiplie par 3 à 4 le risque de mortalité et d'évènements cardiovasculaires (Rennenberg et al., 2009).

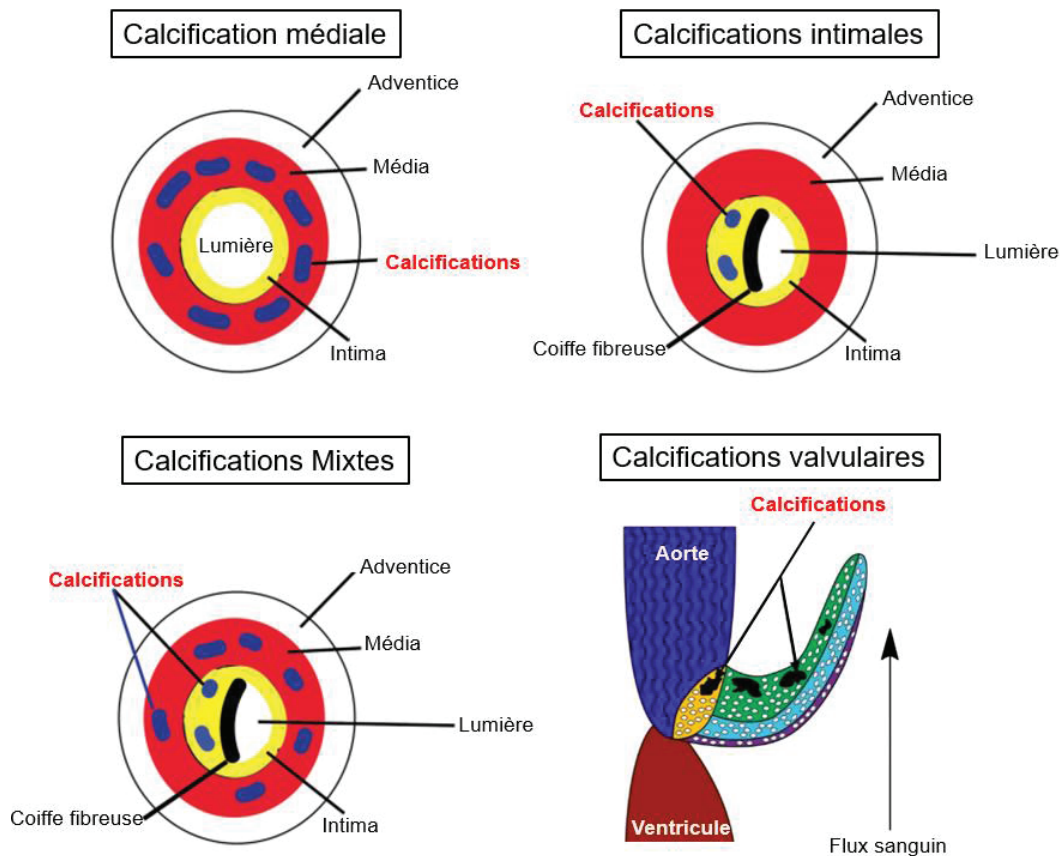


Figure 18 : Les différents types de calcifications vasculaires.

2.5.2 Calcifications intimales

La calcification de l'intima est aussi connue sous le nom de calcification athérosclérotique et est la forme de minéralisation vasculaire avec la plus forte prévalence. Elle se développe à partir d'un dépôt lipidique de type oxystérol qui s'accumule dans la zone sous-intimale. Cette accumulation induit une inflammation chronique et va initier le développement d'une plaque d'athérome entraînant le remaniement de l'intima des artères de gros et moyen calibre comme l'aorte et ses branches. Ce remaniement va aboutir dans sa version la plus avancée à une déformation excentrique du vaisseau avec un cœur lipidique recouvert d'une coiffe fibreuse comportant de forts dépôts minéralisés. Au cours du développement de l'athérome il y a activation de voies de signalisation induisant la transdifférenciation des VSMC en OST-L semblables aux ostéoblastes et aux chondrocytes (Sage et al., 2010) (Thompson and Towler, 2012). Ces OST-L vont produire une matrice minéralisée qui va à son tour favoriser le développement de minéralisations.

Le rôle stabilisateur des dépôts de calcium dans la plaque d'athérome est encore actuellement débattu (Johnson et al., 2006). Il semblerait que seules les minéralisations de la coiffe fibreuse

soient responsables d'une stabilisation de la plaque d'athérome contrairement aux microcalcifications localisées dans le cœur lipidique (Kelly-Arnold et al., 2013).

2.5.3 Calcifications médiales

La calcification de la média artérielle anciennement appelée calcification de Mönckberg se produit principalement dans les petites et moyennes artères musculaires périphériques (Fuery et al., 2017). Elles sont fréquemment rencontrées au cours du vieillissement, du diabète de type II, d'un traitement aux AVK au long cours ou de l'insuffisance rénale chronique. Elle se caractérise par des dépôts concentriques de calcium le long des lames élastiques des artères. La calcification médiale entraîne une rigidification artérielle, mais contrairement à la calcification athérosclérotique elle n'entraîne pas de réduction de la lumière des vaisseaux (ni thrombose ni sténose). Pour ces raisons elle a souvent été classée comme n'entraînant pas de perturbation clinique significative.

L'apparition de calcifications médiales est cependant un facteur de risque important de mortalité et d'amputation chez les patients atteints du diabète de type II (Nelson et al., 1988).

En cas de calcifications importantes de la média des plus gros vaisseaux comme l'aorte, la pression systolique et la vitesse d'onde de pouls vont augmenter du fait de la baisse de la compliance artérielle (Dao et al., 2005). Cela augmente le travail cardiaque, entraîne une hypertrophie du ventricule gauche et favorise la survenue d'accidents cardio-vasculaires.

2.5.4 Calcifications valvulaires

La calcification valvulaire touche les valves cardiaques entraînant leur sténose. Cette sténose est responsable d'insuffisance cardiaque et concerne de 2% à 7% des personnes de plus de 70 ans (Otto and Prendergast, 2014). Le mécanisme impliqué dans ce type de calcification est assez similaire à celui rencontré dans l'athérosclérose. En plus de l'inflammation, les contraintes mécaniques appliquées sur les valves jouent un rôle important dans le développement de la pathologie (O'Brien, 2006). Ainsi une plus grande proportion de sténose aortique est retrouvée chez les personnes présentant des valves aortiques bicuspidées et non tricuspides et les atteintes sont alors plus précoces. Cela est dû à la forme non optimale des valves bicuspidées qui engendre donc un stress mécanique plus important (Freeman and Otto, 2005). En cas de calcifications importantes des valves cardiaques, le traitement consiste en

leur retrait et remplacement par des prothèses mécaniques. Ces prothèses (d'origine biologique ou non) peuvent être à leurs tours sujettes à la calcification et nécessitent un remplacement tous les 10 ans.

2.5.5 Calciphylaxie

La calciphylaxie encore appelée artériopathie urémique calcifiante est une maladie rare avec une prévalence faible de 1% des patients hémodialysés mais associée à une forte mortalité dans 60% à 80% des cas (Dosanjh and Kebebew, 2005). Elle se caractérise par des calcifications médiales diffuses des artérioles des tissus mous sous-cutanés. Ces calcifications se propagent ensuite au niveau de l'intima et s'étendent sur des zones importantes de la peau entraînant une ulcération progressive. Cette ulcération peut entraîner des complications graves comme le sepsis et la mort de l'individu.

2.5.6 Mécanismes impliqués dans les calcifications vasculaires

Lors des calcifications vasculaires, les VSMC se différencient en OST-L. Dans les vaisseaux sanguins calcifiés, on note une augmentation de facteurs de transcriptions comme Msx2, Sox9 ou Runx2 qui sont propres à l'os et aux chondrocytes. Ces cellules de type ostéoblastique vont alors développer des microcalcifications qui vont servir de sites de nucléation permettant ainsi de nouveaux dépôts de calcium et phosphates. Le développement des calcifications vasculaires est semblable à celui retrouvé au cours de la minéralisation osseuse.

Les mécanismes à l'origine de la différenciation des VSMC en OST-L sont multifactoriels. Ils peuvent être d'origine hormonale, liée au stress oxydant, au phénomène d'apoptose ou encore à une diminution des inhibiteurs de calcifications (*figure 19*). Ces différents mécanismes peuvent également être interconnectés et agir en synergie.

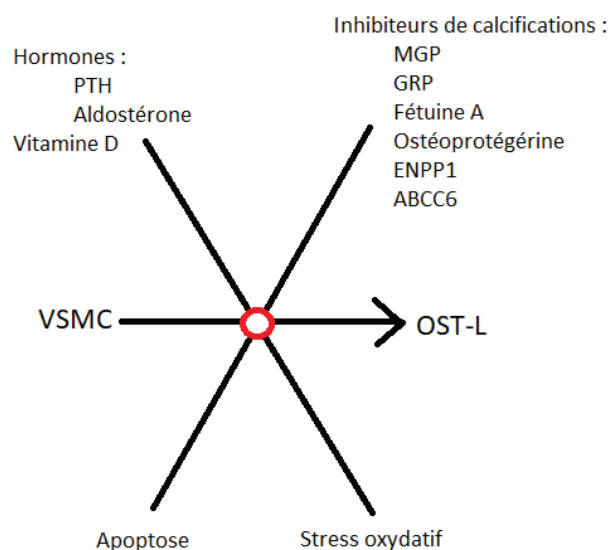


Figure 19 : Les différents mécanismes impliqués dans la différenciation des VSMC en cellules de type ostéoblastiques.

2.5.6.1 Stress oxydatif

En cas de stress oxydatif, l'augmentation de l'activité NAPDH oxydase et celle de la concentration en peroxyde d'hydrogène engendrent une surexpression de Runx2 permettant la transdifférenciation des VSMC en OST-L (Byon et al., 2008). Le diabète et/ou la consommation d'acides gras saturés sont des facteurs stimulant les calcifications vasculaires via l'augmentation du stress oxydatif. Ainsi, des souris nourries avec un régime riche en palmitate développent des calcifications médiales et l'administration d'antioxydant prévient l'apparition de ces calcifications (Brodeur et al., 2013). Les espèces réactives en oxygène (ROS) et différentes cytokines comme le TNF- α peuvent également induire un stress oxydatif au niveau du réticulum endoplasmique. Ce stress oxydatif du réticulum endoplasmique permet la transcription du facteur XBP-1 qui se fixe sur le promoteur de Runx2 (Lieberman et al., 2011).

2.5.6.2 Hormones et vitamine D

Les hormones et notamment les hormones stéroïdes peuvent jouer un rôle important dans le développement des CV. Les œstrogènes ont montré un rôle protecteur sur le développement des CV à la fois in vitro et in vivo (Rzewuska-Lech et al., 2005), (Osako et al., 2010) alors que le rôle de la testostérone est plus controversé (McRobb et al., 2009), (Son et al., 2010).

Le rôle de l'hormone parathyroïde (PTH) est également controversé. Une étude réalisée sur un modèle de rats insuffisants rénaux ayant subi un retrait de leurs glandes parathyroïdes et traités à la PTH montre des calcifications médiales importantes de l'aorte (Neves et al., 2007). Une autre étude montre au contraire que l'administration pulsatile de PTH(1-37) réduit l'apparition des CV (Sebastian et al., 2008).

La vitamine D joue un rôle dose dépendant sur l'apparition des CV. Une dose physiologique en vitamine D va jouer un rôle protecteur alors qu'une dose pharmacologique va être délétère. L'hypervitaminose D induit une hypercalcémie et une hyperphosphatémie qui se traduit par des calcifications rapides (quelques jours) et massives. Cette hypervitaminose s'accompagne de signes cliniques tels qu'une céphalée, une asthénie, une perte d'appétit voire une anorexie, un amaigrissement, une polyurie et de la déshydratation.

L'aldostérone joue un rôle procalcifiant. Elle augmente in vitro l'expression du transporteur du phosphate et des gènes pro-ostéoblastiques au sein des VSMC. Elle augmente également l'activité phosphatase alcaline et l'expression du TNF- α dans cellules OST-L (Jaffe et al., 2007). Une diminution de l'expression du gène *Klotho* (gène qui code pour une protéine transmembranaire dans le rein et les vaisseaux sanguins et qui agit comme un inhibiteur des CV), chez la souris est associée à un hyperaldostéronisme.

2.5.6.3 Apoptose

Au moment de l'apoptose, les VSMC peuvent relarguer des corps apoptotiques qui agissent de manière similaire à des vésicules matricielles contenant du calcium (Proudfoot et al., 2000). Ces corps apoptotiques peuvent initier les dépôts de calcium et de phosphate dans le tissu vasculaire. Inversement, les cristaux de calcium peuvent également induire l'apoptose des VSMC via l'augmentation rapide du calcium intracellulaire.

2.5.6.4 Inhibiteurs de la précipitation

Les concentrations plasmatiques en calcium et phosphate se trouvent en concentration sursaturées. Cela est possible grâce à la présence de puissants inhibiteurs de calcifications. Une diminution de l'expression ou de l'activité de ces inhibiteurs engendre l'apparition de calcifications ectopiques.

La fétuine A est une glycoprotéine plasmatique synthétisée dans le foie et appartenant à la famille des cystatines. Elle agit comme un puissant inhibiteur de la précipitation

phosphocalcique via la formation un complexe transitoire soluble composé de fétuine A et d'hydroxyapatite (calciprotéine). Cette calciprotéine assure le transport et l'élimination des dépôts phosphocalciques vers l'os. Au cours de l'IRC il est montré un déficit en fétuine A, ce qui pourrait en partie expliquer les CV observées au cours de cette pathologie (Ketteler et al., 2003). La fétuine A est également une protéine négative de l'inflammation et son KO chez la souris engendre des calcifications vasculaires (Schafer et al., 2003).

RANK-L (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) est une petite protéine transmembranaire sécrétée exclusivement par les ostéoblastes, les cellules stromales et les cellules T. La fixation de RANKL à son récepteur RANK présent à la surface des ostéoclastes et des cellules dendritiques permet l'activation de la cascade de signalisation. **L'ostéoprotégérine** est un récepteur soluble qui se lie à RANK-L et qui va empêcher la fixation de RANK-L sur son récepteur. L'ostéoprotégérine agit donc comme un puissant inhibiteur de la résorption osseuse diminuant aussi le relargage de calcium et de phosphate au niveau circulant. Les VSMC provenant de calcifications vasculaires expriment moins d'ostéoprotégérine que celles provenant d'artères saines (Malyankar et al., 2000). Des souris déficientes en ostéoprotégérine développent également des calcifications artérielles spontanées (Makarović et al., 2015).

ENPP1 (ecto-ATPase nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1) est un inhibiteur extracellulaire de pyrophosphate qui prévient la formation et la propagation des cristaux d'HA. La transplantation d'une aorte provenant d'une souris WT sur une souris KO ENPP1 engendre l'apparition de CV (Villa-Bellosta et al., 2013). La manipulation inverse permet de prévenir l'apparition des CV montrant bien l'implication de cette protéine dans la régulation des CV.

Une mutation du gène **ABCC6** (ATP-binding cassette subfamily C6) est responsable du pseudoxanthoma elasticum. Cette maladie est associée à des calcifications du tissu conjonctif. Les souris KO ABCC6 présentent une accumulation de calcium artériel 2 fois supérieure à des souris WT (Nitschke and Rutsch, 2012). De même chez les rats insuffisants rénaux il a été montré une diminution de la teneur en protéines ABCC6 (Lau et al., 2014).

La MGP et la GRP sont deux PVKD importantes impliquées dans l'inhibition des CV au niveau tissulaire. Leurs rôles ont déjà été détaillés dans les sections [2.2.4](#) et [2.2.7](#) de ce manuscrit.

2.5.7 Modèles de calcifications vasculaires chez le rat

2.5.7.1 Avec utilisation d'AVK

Paul Price en 1998 et Andrew Howe en 2000 montrent qu'il est possible d'induire des calcifications vasculaires en injectant 1 ou 2 fois par jour une quantité importante de warfarine (proche de 1000 fois la dose toxique) chez les rats mâles de type Sprague-Dawley (SD) pendant plusieurs semaines (Price et al., 1998) (Howe and Webster, 2000).

Pour éviter la mortalité par hémorragie induite par l'utilisation de la warfarine et maintenir une coagulation normale, une injection quotidienne de 10 à 15 mg/kg de vitamine K1 est nécessaire. Cette méthodologie permet l'obtention de calcifications médiales visibles par coloration de Von-Kossa au bout de 2 semaines et qui progressent au cours du temps. Après 5 semaines les calcifications sont si importantes qu'elles sont visibles par radiographie et par simple inspection visuelles (Price et al., 1982) et par coloration au rouge alizarine (Howe and Webster, 2000). Ces calcifications sont présentes au niveau de l'aorte, des valves cardiaques, des artères coronaires, des artères pulmonaires, mais apparemment absentes des veines et des capillaires.

Le mécanisme proposé dans ce modèle repose sur la limitation des PVKD extrahépatiques à se trouver sous leur forme activée (forme physiologiquement active) du fait de l'action des AVK. La MGP qui agit normalement comme un inhibiteur de la calcification ne peut alors plus jouer son rôle. Ni la calcémie ni la phosphatémie ne sont augmentées dans ce modèle.

Aucun trouble lié au métabolisme osseux comme cela est rencontré au cours d'un traitement aux AVK au long court n'est également observé (Price et al., 1982). Il semblerait que l'âge des rats au moment du traitement par la warfarine influe sur le développement des calcifications. Des rats de 20 jours développent des calcifications plus importantes que des rats de 42 jours et aucune calcification n'est observée sur des rats de 10 mois (Price et al., 2000).

La consommation de vitamine K2 semble reverser partiellement les calcifications induites par ce modèle (Schurgers et al., 2007a), (Jiang et al., 2016).

Le modèle de calcification basé sur l'utilisation d'AVK + PK est efficace, mais nécessite plusieurs manipulations quotidiennes sur l'animal. Cette contrainte est assez lourde pour le manipulateur et n'est pas non plus idéale pour le bien-être animal.

Une solution consiste à incorporer la warfarine et la PK directement dans l'alimentation du rongeur. Cela a été réalisé chez la souris avec une augmentation significative de la teneur en calcium au niveau de l'aorte après 28 jours de traitement (Krüger et al., 2013). Aucune donnée chez le rat n'est à ce jour rapportée. Dans ce modèle, l'activité VKOR est inhibée par l'action des AVK, mais la vitamine K absente sous sa forme hydroquinone, s'accumule en grande quantité sous sa forme époxyde. Cela ne reflète pas ce qu'il se passe physiologiquement en

cas de carence ou les 2 formes sont très fortement diminuées. De même il ne reflète pas ce qu'il se passe dans le cadre d'un traitement au long cours aux AVK fréquemment rencontré chez l'Homme. En effet les doses utilisées sont des doses toxiques et non thérapeutiques et font appel à une administration de PK pour en minimiser les effets toxiques.

L'hypervitaminose D est reconnue depuis de nombreuses années pour induire des calcifications vasculaires massives en quelques jours chez le rat (Takeo et al., 1991), (Bajwa et al., 1971). La synergie entre la vitamine D et le traitement à la warfarine du modèle de Price permet d'induire des calcifications plus importantes et plus rapidement que dans le modèle de Price classique (Price et al., 2000). Malheureusement l'association de warfarine et de vitamine D provoque une mortalité importante des individus et rend l'utilisation de cette association inefficace pour établir un modèle de CV durable.

2.5.7.2 Régime riche en phosphate et néphrectomie

Chez le rat, pour induire une IRC proche de celle rencontrée chez l'Homme il est possible de réaliser une néphrectomie partielle accompagnée d'un régime riche en phosphate (Liu et al., 2015), (Hortells et al., 2017) ou d'administrer de l'adénine à fortes doses pendant plusieurs semaines (Yokozawa et al., 1986), (Diwan et al., 2013) (Al Za'abi et al., 2015), (Nguy et al., 2016). L'adénine est néphrotoxique et reste la solution la plus simple à mettre en place pour induire l'IRC puisqu'il suffit de l'ajouter au régime alimentaire ou par injection intrapéritonéale pour observer le développement de l'IRC en quelques semaines. Il va y avoir une atrophie rénale accompagnée d'une destruction glomérulaire, une accumulation de cristaux de calcium et la présence de granulomes dans les tubules rénaux et l'espace interstitiel. Dans le stade avancé une fibrose est également observée. Ces altérations s'accompagnent au niveau systémique d'une forte augmentation, de l'acide urique plasmatique, de la concentration en minéraux (Ca, Pi, K, Na) et de la créatinine avec une clairance en dessous de 10%. Le profil en acide aminé libre est aussi altéré avec une diminution en acides aminés essentiels. Une augmentation de l'aldostérone et de la PTH et une diminution de la vitamine K plasmatique sont également observées. Au niveau vasculaire on observe une hypertension accompagnée d'une diminution de la compliance artérielle. Ces atteintes vasculaires sont complétées par des calcifications importantes de la média artérielle.

2.5.7.3 Avec carence en vitamine K

La carence en vitamine K chez le rat a été traitée dans la partie 2.1.6.2 de ce manuscrit. Toutes les études mentionnées dans cette section décrivent l'apparition et la prévention des syndromes hémorragiques induits par la carence, mais aucune ne met en évidence de lien entre carence en vitamine K et calcifications vasculaires chez ces animaux.

Une récente étude de 2016 avait pour objectif de proposer un nouveau modèle de carence en vitamine K chez le rat. Ce modèle repose sur l'utilisation de rats mâles de types SD soumis à un régime déficient en vitamine K plus l'administration de gentamicine. Dans ce modèle, la gentamicine a pour but de limiter la synthèse de MK par la flore intestinale. Cette production bien que faible pourrait contribuer à l'apport direct ou indirect (via la coprophagie) en vitamine K et ainsi rendre inefficace la tentative de carence comme cela a été observé chez la souris (Komai et al., 1988). Les auteurs parviennent à créer un état de carence en 14-21 jours caractérisé par une augmentation du temps de prothrombine, une diminution du facteur II, VII, IX et X de la coagulation et des seuils indétectables de PK et MK4 dans le foie (Mi et al., 2016). Aucune information n'est cependant apportée sur le niveau de gamma-carboxylation des PVKD impliqués dans l'inhibition des calcifications vasculaires comme la MGP, la GRP ou l'ostéocalcine. Aucune information n'est également donnée sur la teneur en calcium tissulaire.

3 CONTEXTE & OBJECTIFS

La vitamine K est indispensable au maintien de l'hémostase *via* la synthèse de certains facteurs de la coagulation, mais aussi au maintien de l'intégrité cardiovasculaire grâce à la synthèse de protéines inhibitrices de calcifications. Ces calcifications vasculaires chez l'Homme sont rencontrées principalement au cours du diabète de type II, de l'insuffisance rénale chronique ou tout simplement au cours du vieillissement. Si l'état de carence totale en vitamine K n'est pas décrit chez l'Homme, un état de subcarence peut exister dans la population générale. Au cours de cet état de subcarence, la vitamine K se trouve en quantité suffisante pour maintenir une coagulation normale, mais en quantité insuffisante pour maintenir les fonctions moins vitales comme l'inhibition des calcifications vasculaires.

L'étude des relations entre l'état de subcarence en vitamine K et celle des calcifications vasculaires se révèle très compliquée chez l'Homme, mais elle peut être approchée en ayant recours à un modèle animal. À ce jour il n'existe malheureusement à notre connaissance aucun modèle murin de subcarence en vitamine K décrit dans la littérature scientifique.

Comme pour l'Homme, les besoins du rat en vitamine K sont très faibles. La carence totale aboutit à la mort des individus par hémorragie et les tentatives de subcarences sont sans effets sur le développement de calcifications vasculaires. Ces constatations laissent à penser que la marge entre besoin vital et subcarence est très faible chez cette espèce.

En Europe et dans le reste du monde, la régulation des populations de rongeurs via l'utilisation d'AVK depuis plusieurs décennies a conduit à l'émergence de populations de rats résistants à ces molécules. Ces rats présentent un polymorphisme du gène *Vkorc1*. Ce gène responsable du recyclage de la vitamine K est aussi la cible des AVK. Ces différentes mutations rendent ces rats moins sensibles aux AVK ; c'est l'avantage de la mutation. En contrepartie, ces rats nécessitent plus de vitamine K dans leur alimentation à cause d'un recyclage moins efficace, c'est le coût biologique de la mutation.

En situation normale à l'état naturel, ces besoins augmentés sont facilement compensés bien que des calcifications vasculaires aient été retrouvées chez des vieux rats mâles sauvages homozygotes C139 sur le gène *Vkorc1* (*Vkorc1*^{C139/C139}) (Kohn et al., 2008). Une étude de 2013 réalisée à l'USC1233 a montré *in vitro* que cette mutation engendrait une activité catalytique fortement altérée de l'enzyme *Vkorc1* avec la production d'un métabolite inactif (Matagrín et

al., 2013). Ces rats *VKORC1^{C139/C139}* pourraient disposer d'une fenêtre de besoin en vitamine K entre carence et subcarence plus large que pour les rats standards.

En créant une lignée consanguine de rat *VKORC1^{C139/C129}* introgressés sur fond génétique de rats standards de laboratoires et en modulant les apports en vitamine K dans l'alimentation de ces animaux, il serait alors possible d'induire des calcifications vasculaires.

Ces calcifications induites par une subcarence en vitamine K serviraient alors de modèle d'étude pour mieux comprendre les phénomènes observés chez l'Homme.

Le laboratoire USC1233 dispose de différentes souches résistantes aux AVK comme les souches C139, Y139 et Q120 (*cf section 2.1.5.5.2.3*).

Le but de cette thèse est de proposer, à partir des 3 lignées résistantes disponibles, un modèle de subcarence en vitamine K chez le rat permettant l'étude des calcifications vasculaires associées.

Pour atteindre ce but, 4 objectifs principaux ont été développés au cours de cette thèse :

1) Caractériser la lignée C139 dans le cadre d'un élevage classique et d'une alimentation de laboratoire standardisée

On entend par lignée C139, des rats dont le fond génétique est celui des rats Sprague Dawley néanmoins ces animaux sont porteurs de la mutation Y139C sur leur gène *Vkorc1*. L'introggression sur 10 générations ne laisse que 0,1% du génome sauvage dans la souche utilisée. Cette fraction sauvage est en outre éparpillée dans tout le génome et ne peut plus être homozygote. Evidemment le gène introgressé entraîne avec lui une part du chromosome 1 du rat. La taille du fragment introgressé a été évaluée dans une expérience similaire (mutation Y139F sur 7 générations) et était de l'ordre de 20 à 30 millions de bases. L'USC1233 dispose de rats très proches des rats SD mais avec essentiellement une modification du chromosome 1 autour du gène *VKORC1* porteur d'une mutation. Les différences phénotypiques observées entre les rats SD et cette lignée sont donc essentiellement liées à la mutation du gène *VKORC1* et éventuellement à des gènes sauvages localisés entre les bases 170 millions et 210 millions.

Le premier objectif était d'établir la lignée C139 et de la caractériser en condition d'élevage standard de laboratoire. En effet, la perte en vitamine K liée aux modifications de la catalyse et la description en milieu naturel de calcification anormale chez des rats sauvages porteurs de cette mutation à l'état homozygote peut permettre de penser que des modifications du statut vitaminique, de l'équilibre phosphocalcique pourraient apparaître dans cette lignée et enfin que l'apparition de calcification sur des animaux adultes voire âgés, pourraient survenir. Il a fallu s'assurer que la mutation homozygote CC et hétérozygote YC au sein de la lignée

C139 maintenue dans des conditions standards n'entraînait aucune modification par rapport aux individus non mutés YY. Dans ce cadre-là, la fonction reproductrice, la répartition des différents génotypes et du sexe à la naissance, l'aspect morphologique, les constantes biochimiques, la coagulation, la teneur en calcium ainsi que la teneur en vitamine K tissulaire ont été évalués.

2) Caractériser le modèle de calcifications vasculaires chez le rat mâle CC.

Le deuxième objectif était d'évaluer chez les rats CC, l'impact d'une subcarence en vitamine K de plusieurs semaines sur l'apparition des calcifications vasculaires. Ces calcifications ont été caractérisées d'un point de vue qualitatif et quantitatif dans différents tissus. L'aspect du génotype, du sexe et du temps de carence ont également été explorés.

Il s'agit de l'axe central de ce travail de thèse puisque c'est dans cette partie que le modèle de calcification médié par une carence en vitamine K a été caractérisé.

3) Comparaison du besoin en vitamine K des différentes lignées

Ce troisième avait pour objectif d'évaluer l'impacte des mutations de *Vkorc1* sur les besoins en vitamine K des différentes lignées présentes au laboratoire de l'USC1233. Cette évaluation a été faite en observant l'évolution de différents marqueurs de la carence représentés par le facteur II, le temps de Quick, la vitamine K tissulaire et l'ostéocalcine, dans les jours qui suivent la mise en carence en vitamine K chez ces rats.

4) Voies d'amélioration du modèle de calcification proposé : le rôle de *Vkorc111*.

Le modèle proposé dans l'axe 2 provoque des calcifications artérielles très importantes. Néanmoins, et de façon inattendue, ces calcifications sont remarquablement visibles dans les testicules des rats. Jamais, cette localisation n'avait été suggérée dans la littérature et en particulier dans les études cliniques développées chez des patients sous warfarine ou les modèles utilisant ce même anticoagulant.

Les travaux relatifs au métabolisme de la vitamine K et en particulier les travaux sur l'enzyme *Vkorc111* ont montré que cette enzyme est particulièrement abondante dans le testicule et particulièrement résistante à la warfarine (Hammed et al., 2013). Il nous est apparu que les effets de la warfarine ne pouvait pas être observé dans un organe riche en *Vkorc111* et donc capable de recycler la vitamine K même sous traitement anticoagulant (modèle de price). La carence en vitamine K ne provoque cependant des calcifications, que lors de déplétion

extrême en MK4 dans le testicule. La présence de cette enzyme pourrait n'avoir aucun effet dans notre modèle.

Dans ce 4^{ème} axe nous avons donc décidé de mettre en place une étude relative au fonctionnement de cette enzyme. Pour cela l'effet d'autres anticoagulants que la warfarine ont été étudiés à la fois sur VKORC1 et VKORC1-L1. La découverte d'un inhibiteur spécifique à Vkorc1-L1 pourraient permettre de confirmer le rôle de cette enzyme dans le développement des calcifications artérielles.

4 MATERIEL ET METHODES

4.1 Animaux

Des rats sauvages homozygotes $Vkorc1^{C139/C139}$ initialement piégés en Allemagne ont été offerts par l'institut Julius Kühn (Quedlinbourg, Allemagne). Pour former une lignée consanguine, 4 mâles homozygotes $Vkorc1^{C139/C139}$ ont été croisés avec 4 femelles Sprague-dawley ($Vkorc1^{Y139/Y139}$) (Charles river, Arbresle, France) pour créer la génération F1. Les individus mâles F1 ont été reproduits avec les femelles F1 pour donner naissance à la génération F2. Les différents génotypes des individus de la génération F2 ont été identifiés par génotypage. Les femelles hétérozygotes F2 $Vkorc1^{Y139/C139}$ ont été mises en reproduction avec des mâles Sprague-dawley, et cela sur les 8 générations suivantes pour aboutir à la génération F10. Les mâles et femelles hétérozygotes F10 ont été mis en reproduction et ont donné naissance à la lignée C139 qui a été utilisée pour les travaux de cette thèse.

Les rats sauvages $Vkorc1^{F139/F139}$ ont été piégés par l'USC1233 et les rats sauvages $Vkorc1^{Q120/Q120}$ ont été donnés par Sorex Limited (Widnes, UK). La même procédure a été appliquée à ces rats pour obtenir les lignées introgressées F139 et Q120.

Pour la suite de ce manuscrit, les différentes lignées et génotypes seront nommés de la manière suivante :

SD = Lignée Sprague-dawley $Vkorc1^{Y139/Y139}$

YY = Lignée C139 $Vkorc1^{Y139/Y139}$

YC = Lignée C139 $Vkorc1^{Y139/C139}$

CC = Lignée C139 $Vkorc1^{C139/C139}$

FF = Lignée F139 $Vkorc1^{F139/F139}$

QQ = Lignée Hampshire = Lignée Q120 $Vkorc1^{Q120/Q120}$

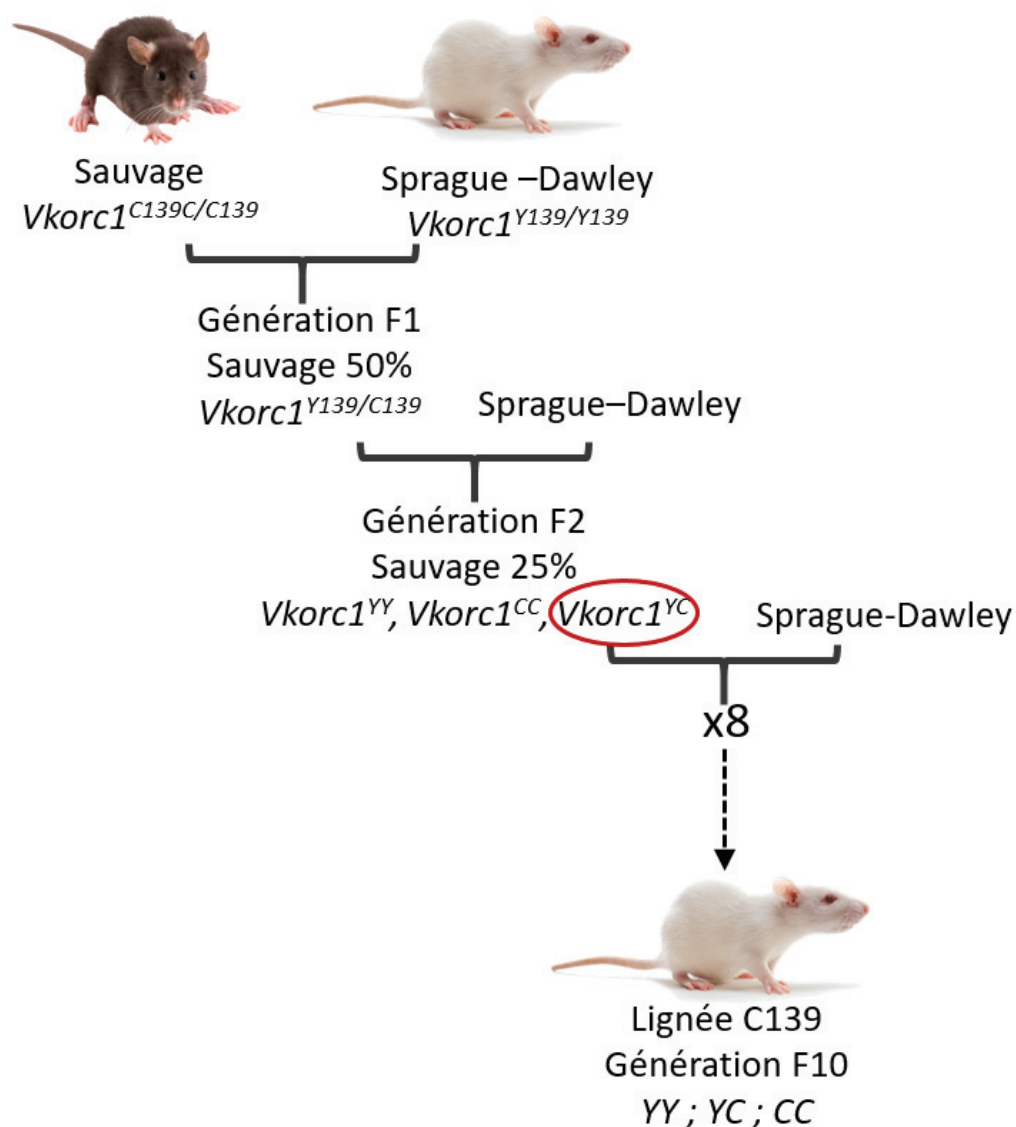


Figure 20 : Stratégie mise en place pour la création de la lignée C139

Les différentes procédures réalisées sur les animaux au cours de ce projet ont fait l'objet d'une évaluation favorable du comité d'éthique de VetAgro Sup sous le numéro 1642-V3.

4.2 Régimes alimentaires

Au cours de ce projet, 4 régimes alimentaires ont été utilisés :

- Un régime standard naturel avec ménadione (A04 avec MD) : SAFE A04 (U8220G10R) qui a servi de nourriture de base pour l'entretien des lignées. La teneur en vitamine K₃ dans le produit fini est comprise entre 2,5 et 4,8 mg/kg.

- Un régime standard naturel sans ménadione (A04 sans MD): SAFE A04 sans vitamine K₃ et sans orge (U8220P9902 v231). Ce régime repose sur la base du régime standard SAFE A04 auquel l'orge, qui est potentiellement une source de vitamine K, a été remplacée par de l'amidon. Ce régime a été utilisé pour la carence en vitamine K à long terme des animaux.
- Un régime synthétique sans ménadione (AIN93M sans MD) : SAFE AIN 93M sans vitamine K (U8978P9902 v68). C'est une formulation « synthétique » répondant aux besoins nutritionnels des rats, mais toutes les sources de vitamines K ont été minimisées. Ce régime a servi à carencer les rats sur des courtes périodes.
- Un régime synthétique standard (AIN93M avec MD) : SAFE AIN 93M avec 0,02g/kg de vitamine K₃ (U8978P9902 v69). Il s'agit du même régime précédent, mais enrichi en vitamine K₃ à raison de 20 mg/kg. Ce régime a servi de témoin de non-carence.

4.3 Réactifs

Les réactifs utilisés au cours de ce travail de thèse proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) et les solvants ont été fournis par VW. Dans le cas contraire, le nom du fournisseur est indiqué.

4.4 Génotypage

L'ADNg a été extrait à partir d'un échantillon de queue de 0,3 cm ou d'une phalange en utilisant un KIT d'extraction rapide reposant sur le principe de la lyse alcaline « Extracta™ DNA Prep for PCR – Tissu extraction kit » (Quanta, Biosciences). L'identification des génotypes des 2 allèles de *Vkorc1* a été réalisée à l'aide de différents couples d'amorces (Eurogentec, Anger, France) en fonction du génotype recherché.

Amorces Sens :

<i>Vkorc1</i> ^{Y139/Y139} :	5'- CATTGTTTGCATCACCAC CTA -3'
<i>Vkorc1</i> ^{C139/C139} :	5'- CATTGTTTGCATCACCAC CTG -3'
<i>Vkorc1</i> ^{F139/F139} :	5'- CATTGTTTGCATCACCAC CTT -3'
<i>Vkorc1</i> ^{L120/L120} :	5'- TGTCGCTGGTTCTCTGTAC CT -3'
<i>Vkorc1</i> ^{Q120/Q120} :	5'- TGTCGCTGGTTCTCTGTAC CA -3'

Amorce antisens :

Vkorc1^{Y139/Y139, F139/F139 et C139/C139} : 5'- TCAGGGCTTTTTGACCTTGTG -3'

Vkorc1^{L120/L120, Q120/Q120} : 5'- TCAGGGCTTTTTGACCTTGTG -3'

Les 135 paires de base du gène Vkorc1 ont été amplifiées par PRC quantitative (PCR-Q) à l'aide du thermocycleur MX300P (Stratagène, Massy, France).

Pour chaque amplification, le milieu réactionnel était constitué de :

- 5X HOT BIOAmp EvaGreen qPCR mix (Biofidal, Vaulx-en-velin, France) : 3 µl
- ADNg: 2µl
- Amorce sens à 0,5 pmol/µl : 1µl
- Amorce antisens à 0,5 pmol/µl : 1µl
- Eau mili-Q : 7µl

Le tampon 5X hot contient les dNTPs, l'ADN polymérase HOT BIOamp, le fluorophore EvaGreen et le sel de magnésium MgCl₂ à 12,5 mM.

Le premier cycle a été initié par une étape de dénaturation à 95°C pendant 5 minutes suivit de 40 cycles constitués de :

- Dénaturation : 15 secondes à 95°C
- Hybridation : 20 secondes à 64°C
- Elongation : 20 secondes à 72°C

La spécificité de l'amplification est vérifiée après 40 cycles grâce à la courbe de dissociation déterminée en augmentant la température de 60°C à 95°C par pas de 0,01°C.

Le niveau de fluorescence a été enregistré à la fin de chaque étape d'hybridation. Le point auquel le produit de PCR est détecté pour la première fois au-dessus du seuil du bruit de fond correspond au cycle seuil (Ct) et a été déterminé en doublet et moyenné pour chaque échantillon. Les 3 génotypes possibles (homozygote non muté, hétérozygote, homozygote muté) ont été déterminés en fonction de la différence entre les Ct (ΔCt) des 2 mix :

$\Delta Ct > 2$: génotype homozygote du mix ayant le plus petit Ct.

$\Delta Ct < 2$: génotype hétérozygote.

4.5 Biochimie

Le sang prélevé par ponction intracardiaque sous anesthésie gazeuse a été disposé dans des tubes secs et centrifugé 10 minutes à 3000 rpm. Le sérum obtenu a été congelé à -80°C jusqu'à utilisation. Les paramètres biochimiques ont été déterminés par des méthodes colorimétriques à l'aide d'un automate Konelab 20 (Thermofisher, Cergy Pontoise, France) et des réactifs appropriés (Termo Fisher Diagnostics, Dardilly, France).

4.6 Temps de coagulation et activité des facteurs de la coagulation vitamine K dépendant

Le sang prélevé par ponction intracardiaque sous anesthésie gazeuse a été disposé dans des tubes citratés et centrifugé 10 minutes à 3000 rpm. Le plasma obtenu a servi immédiatement à la détermination du temps de prothrombine et le reste a été congelé à -80°C jusqu'au dosage des facteurs de la coagulation vitamines K dépendants. Le temps de prothrombine a été déterminé à partir de 100 µl de plasma et 200 µl de thromboplastine (Neoplastin CI, INR Determination kit, Diagnostica Stago, Asniere, France) à l'aide du dispositif Biomerieux Option 2 plus (Behnk Electronick, Norderstedt, Germany) en accord avec les recommandations du fournisseur.

L'activité des facteurs de la coagulation vitamines K dépendants a été quantifiée par une méthode chromogénique à la p-nitro aniline à l'aide d'un automate Konelab 20 (Thermofisher, Cergy Pontoise, France) avec les réactifs Hyphen Biomed. Pour exemple, le facteur II était activé par incubation du plasma dans 0,25 mg/ml de venin de serpent *Echis Carinatus* et dans un tampon Tris (0,1 mM Tris HCl, pH 8,3 à 25°C plus 0,2% BSA) à 37°C pendant 10 minutes. L'absorbance à 405 nm a été enregistrée pendant 1 minute après l'ajout de 50 µg de substrat chromogénique.

4.7 Calcium tissulaire

Les tissus ont été prélevés au moment de la mise à mort des animaux, rincés à l'aide d'une solution de sérum physiologique et fixés dans une solution de formaldéhyde 4% pendant 24h minimum. L'évaluation qualitative et quantitative du calcium tissulaire a ensuite été effectuée.

4.7.1 Aspect quantitatif

Les tissus ont été placés dans une étuve à 50°C pendant 72h minimum puis ils ont été réduits en poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon en verre. Le calcium a été extrait à partir de 10 à 50 mg de poudre en fonction de l'organe dans 200 µl à 1 ml d'une solution d'acide formique à 10% pendant au moins 2h. Le surnageant a été prélevé après centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes et évaporé à 110°C. Le résidu sec a été remis en suspension dans de l'eau mili-Q correspondant à la moitié du volume de la quantité de surnageant prélevé. Cette solution a servi au dosage du calcium via l'utilisation d'un kit de dosage colorimétrique à la crésol-phtaléine (SigmaAldrich, l'Isle d'Abeau, Chesnes, France) en accord avec les recommandations du fournisseur.

4.7.2 Aspect qualitatif

4.7.2.1 Coupes histologiques

Les tissus ont été enrobés dans des blocs de paraffine, coupés par tranche de 3,5 µm à l'aide d'un microtome automatique HM 355s (Thermo Fisher Scientific) et séchés pendant 2h à 37°C sur des lames de verre. La lame a ensuite subi plusieurs traitements successifs en fonction de la coloration désirée :

Von-Kossa

- Déparaffiner : trois rinçages de 10 minutes dans une solution OTTIX plus (Microm Microtech, france), 2 minutes dans une solution OTTIX Shapper (Microm Microtech, france) et 1 minute dans de l'éthanol 100%.
- Réhydratation à l'eau courante de 2 fois 30 secondes.
- Imprégnation au nitrate d'argent 5% pendant 30 minutes sous une source lumineuse intense.
- Fixation dans une solution de thiosulfate de sodium 5% pendant 3 minutes.
- Rinçage à l'eau distillée
- Coloration à la solution de Kernechtrot (1g de rouge nucléaire solide pour 100 ml d'eau distillée) pendant 10 minutes.
- Rinçage à l'eau distillée

- Déshydratation : un passage dans de l'éthanol 100%, 30 secondes dans la solution OTTIX Shapper et 3 passages de 5 minutes dans une solution OTTIX plus.

4.7.2.2 Hémalun éosine

- Déparaffiner : trois rinçages de 10 minutes dans une solution OTTIX plus, 2 minutes dans une solution OTTIX Shapper et 1 minute dans de l'éthanol 100%.
- Réhydratation à l'eau courante de 2 fois 30 secondes.
- Coloration à l'hémalun pendant 5 minutes.
- Passage dans un bain HCL 0,1%.
- Rinçage à l'eau
- Passage dans l'eau lithinée (carbonate de lithium à saturation dans de l'eau distillée)
- Rinçage à l'eau
- Coloration à la phloxine (1g de phloxine B pour 100ml d'eau distillée) pendant 5 minutes.
- Rinçage à l'eau
- Déshydratation : un passage dans de l'éthanol 100%, 30 secondes dans la solution Shapper et 3 passages de 5 minutes dans une solution OTTIX.

Les images ont été obtenues à l'aide du microscope Olympus BX50 (Olympus, France) couplé à un appareil photo Coolpix 4500 (Nikon, France). Les images ont été traitées avec le logiciel eclipsnet version 1.20.0.

4.7.2.3 Coloration au rouge alizarine

Une fois fixées dans la solution de formaldéhyde et dégraissées les aortes ont été rincées 3 fois dans une solution de KOH à 0,5%. La coloration a été effectuée pendant 24h dans une solution de KOH 0,5 % contenant 20 mg/l de rouge alizarine. Les aortes ont été rincées dans 3 bains successifs de glycérol de plus en plus concentrés (3 volumes de KOH 0,5% pour 1

volume de glycérol, 1volume/1volume et 1volume/3volumes). La conservation des aortes s'est faite dans une solution pure de glycérol.

4.7.2.4 μ CT

L'analyse par μ CT a été réalisée après l'euthanasie des rats par injection létale de pentobarbital sous anesthésie gazeuse. Trois périodes successives d'acquisition ont été faites pour détecter les calcifications dans les régions spécifiques. La première région d'intérêt incluait les poumons, l'aorte et la crosse aortique, la seconde concernait les reins et la troisième les testicules. Les acquisitions ont été faites avec un champ de 80 mm de diamètre et 35 mm de profondeur avec une taille des pixels de 90 μ m. Une segmentation manuelle a ensuite été réalisée autour de chaque région cible (reins, aorte, poumons, testicules). La densité naturelle de ces 4 régions étant différente, le bruit de fond a été adapté à chacun de ces tissus pour exclure le tissu non minéralisé de la quantification. Les différents niveaux de sensibilité pour chaque organe étaient de 50 HU pour les poumons et les reins, 25 HU pour l'aorte et 30 HU pour les testicules. Dans certaines régions d'intérêt, la présence d'os à proximité a généré quelques artefacts. Ces artefacts n'ont pas été pris en compte lors du calcul final du volume des calcifications.

4.8 Vitamine K testiculaire et hépatique

4.8.1 Extraction de la vitamine K tissulaire

Un testicule ou un lobe de foie a été homogénéisé à l'aide d'un ultra-turrax (junke-kunkel, France) et 0,5 g de broyat a été pesé et supplémenté avec 12,8 ng d'étalon interne K1ox (absent naturellement des échantillons). Un volume de 6 ml d'une solution éthanol/eau (66%, 33%) a été ajouté et le tout a été vortexé vigoureusement pendant 1 minute pour permettre la précipitation des protéines. La vitamine K a été extraite avec un volume de 4 ml de cyclohexane et le tout a été vortexé pendant 1 minute puis centrifugé à 3000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant a été récupéré et disposé dans un nouveau tube puis une seconde extraction au cyclohexane a été effectuée. Le 2ème surnageant a été ajouté au premier et le tout a été évaporé à 40°C sous un flux d'air. L'extrait sec a été repris avec 500 μ l de méthanol et disposé dans des vials opaques en attendant le dosage de la vitamine K par HPLC-fluo.

4.8.2 Dosage de la vitamine K tissulaire

Le système HPLC était constitué d'une pompe PU-2089 (Jasco, France), d'un auto-injecteur AS-2051 (Jasco, France), d'un détecteur fluorescent FP-2020 (Jasco, France) réglé sur une longueur d'onde d'excitation de 240 nm et d'émission de 430 nm. L'ensemble était piloté par le module LC-Net II / ADC (Jasco, France). La séparation de l'échantillon était assurée par une colonne de silice C18 LiChrospher® 100 RP-18 Endcapped (4,6 mm, 25 mm, 5 µm). Une post-colonne (2,1 mm, 50 mm) remplie de poudre de zinc de particules inférieures à 150 µm était disposée entre la colonne et le détecteur. Cette post-colonne assure la réduction de la vitamine K pour permettre sa détection par fluorescence.

Les phases mobiles A [méthanol (97%), eau (2%), acide acétique (1%), acétate de zinc (1,1g/l)] et B [méthanol 50%, dichlorométhane 49%, acide acétique 1%, acétate de zinc 1,1g/l] ont été utilisées avec un débit de 1 ml/min d'après le gradient suivant :

	Time (min)	Flow (ml/min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
1	Initial	1.000	100.0	0.0
2	25.00	1.000	100.0	0.0
3	25.10	1.000	0.0	100.0
4	31.00	1.000	0.0	100.0
5	31.10	1.000	100.0	0.0
6	42.00	1.000	100.0	0.0

Dans ces conditions HPLC la MK4ox (ménaquinone 4 époxyde), la MK4, la K₁ox (phyloquinone époxyde) et la K₁ sont éluées à 11,78 min, 17,48 min, 21,94 min et 29,88 min respectivement. Aucun four à colonne n'a été utilisé et des variations de température au sein de la pièce d'analyses ont pu légèrement influencer sur le temps de rétention des composés.

4.9 Ostéocalcine

Le dosage plasmatique de l'ucOC a été réalisé à partir du kit MK146 « Rat Glu-osteocalcin High Sensitive EIA » (TAKARA). Ce kit repose sur une technique Elisa en sandwich. La plaque est précotée avec un anticorps monoclonal de capture reconnaissant la région C-terminale de l'ostéocalcine de rat. L'anticorps de détection est spécifique des résidus Glu en position 21 et 24 de l'OC de rat et il comporte une activité peroxydase. L'ajout du substrat 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine en agissant avec la peroxydase permet la quantification de l'ucOC en enregistrant l'absorbance à 450 nm à l'aide du lecteur de plaque synergy H1 (BioTeck).

5 OBJECTIF 1 : CARACTERISATION DE LA LIGNEE C139.

5.1 Objectif :

Pour pouvoir travailler sur les animaux sauvages porteurs de la mutation $Vkorc1^{C139/C139}$ la première étape a été de les faire se reproduire sur plusieurs générations avec une souche standard de rats de laboratoire tout en gardant le gène d'intérêt dans la descendance. Cela a permis d'obtenir la lignée C139 sur un fond génétique connu et contrôlé de type Sprague-dawley. On parle alors d'introgession. Cette étape d'introgession était avancée jusqu'à la 7^{ème} génération avant le début de cette thèse et été poursuivi jusqu'à la 10^{ème} génération. Avant de procéder aux premières expérimentations sur la carence il a fallu s'assurer que la mutation à l'état homozygote et hétérozygote n'entraînait pas d'altération de la reproduction, de la croissance, des paramètres biochimiques, de calcifications vasculaires, de troubles de la coagulation ou encore d'apparition de signes cliniques en condition normale d'hébergement et avec une alimentation standard.

5.2 Méthodes :

Après avoir obtenu la génération F10 de la lignée C139, 11 couples de mâles et femelles YY, YC et CC ont été mis en reproduction à l'âge de 8-10 semaines. La fonction reproductrice de ces couples a été évaluée en observant le temps séparant la présentation du mâle à la femelle et la mise bas, ainsi que le nombre de petits à la naissance.

La répartition des différents génotypes et des sexes a également été évaluée au cours des différents cycles de reproduction entre individus hétérozygotes qui ont eu lieu pendant la période de janvier 2015 à janvier 2017.

Pour évaluer les aspects autres que ceux liés à la reproduction, 18 rats mâles de chaque génotype (YY, YC, CC) issus de reproductions YC* YC ont été utilisés. Après leur sevrage à 4 semaines, les animaux ont été alimentés avec le régime A04 avec ménadione pendant 5 mois. Le poids de chaque individu a été relevé toutes les 4 semaines durant cette période. À l'âge de 6 mois, 9 mâles de chaque génotype ont été mis à mort et l'aspect morphologique, les paramètres biochimiques, le taux de prothrombine, la concentration en vitamine K testiculaire, et le calcium au niveau de l'aorte ont été quantifiés. Les animaux restants (9 rats par génotype) ont continué à recevoir le même régime pendant encore 6 mois. Le poids des

animaux a été suivi pendant cette période et après la mise à mort des animaux le calcium tissulaire a été évalué à la fois d'un point de vue qualitatif et quantitatif.

5.3 Résumé des principaux résultats :

Les 3 génotypes YY, YC et CC de la lignée C139 présentent une reproduction, une croissance, une morphologie, et des paramètres biochimiques plasmatiques similaires. Seule la concentration en vitamines K (MK4 et MK4ox) testiculaire est plus importante pour les individus YY que pour les individus CC. Les individus YC semblent disposer d'une concentration intermédiaire en vitamines K avec les 2 autres génotypes bien que cette observation ne soit pas statistiquement significative. Le statut basal en vitamine K plus faible pour les rats CC semble tout de même répondre à leurs besoins physiologiques puisqu'aucune calcification ni augmentation du calcium tissulaire n'est observé. De même la coagulation appréciée au travers du temps de quick et de l'activité du facteur II est comparable à celle retrouvée dans les 2 autres génotypes.

5.4 Résultats détaillés :

5.4.1 Fonction reproductrice

La reproduction entre des individus mâles et femelles hétérozygotes a engendré 292 naissances dont 54,1% de mâles et 45.9% de femelles. Comme attendu dans une répartition de type mendélienne, environ 50 % des individus sont de type hétérozygotes YC et 25 % sont de type homozygote YY et CC (*tableau 7*). La reproduction à l'état hétérozygote ne privilégie pas un génotype ou un sexe particulier et ne s'accompagne pas de mortalité fœtale.

*Tableau 7 : Répartition des 3 différents génotypes et du sexe après croisements de rats YC*YC. Résultats exprimés en pourcentages et valeurs absolues pour 292 rats. Tes chi-2*

	YY	YC	CC
158 ♂ (±54,1%)	31 (20%)	78 (49%)	49 (31%)
134 ♀ (±45.9%)	30 (22%)	71 (53%)	33 (25%)

Le temps entre la présentation du mâle à la femelle et la mise bas n'est pas différent en fonction du génotype du couple reproducteur. Elle est de 24,7 25,5 et 24,5 jours pour les couples YY, YC et CC respectivement (*figure 21 gauche*). La taille moyenne des portées à la

naissance est de 11,9 13,1 et 12,6 petits et aucune différence n'est là aussi observée (*figure 21 droite*).

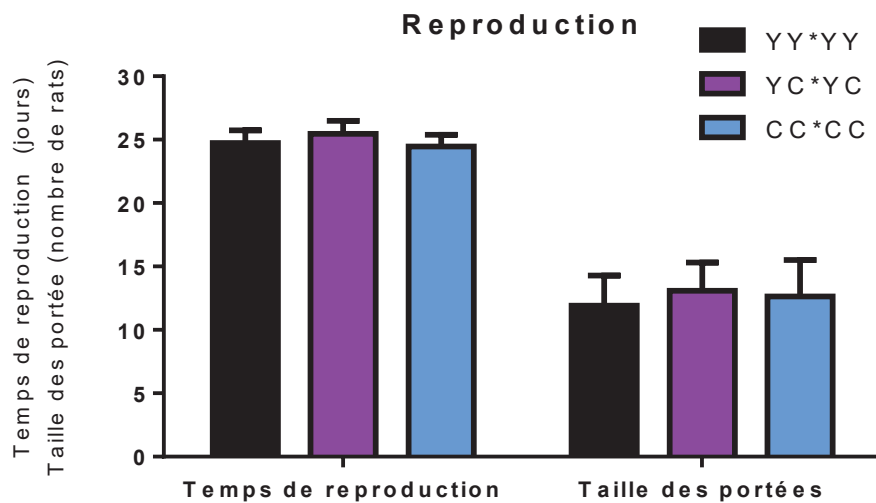


Figure 21 : Temps entre la présentation du mâle à la femelle et la mise bas (gauche) et taille des portées à la naissance (droite). Résultats en fonction du croisement entre les 3 différents génotypes. n=11 par groupe.

Ces résultats semblent indiquer l'absence d'effet de la mutation aussi bien à l'état hétérozygote qu'homozygote sur les paramètres de reproduction et de la répartition des génotypes à la naissance. Dans une étude de 2011 Jacob *et al* montrent une altération de la fonction reproductrice chez des rat CC par rapport aux rats YY avec 20% de naissance en plus chez les couples de rats non mutés (Jacob et al., 2012). Chez le mâle aucune modification du poids des testicules, de l'épididyme et de la mobilité des spermatozoïdes n'était retrouvée. Aucune donnée n'explique la différence observée chez le mâle. Cette baisse de fonction reproductrice serait due aux femelles, mais aucune explication n'est avancée. Dans cette étude les rats CC et YY ont été introgressés sur seulement sur 2 générations avec des rats SD. Les rats obtenus pour la réalisation de l'étude restent relativement proche du génotype sauvage (25% de génome sauvage) comparativement aux rats utilisés dans ce travail de thèse qui ont été introgressés sur 10 générations (0,1% de génome sauvage). Les rats SD sont une lignée consanguine avec une très bonne capacité de reproduction. Cette différence d'introgression pourrait expliquer les différences observées entre ces 2 études.

5.4.2 Croissance et données morphologiques

Après avoir été nourri pendant 5 mois avec un régime standard A04 avec ménadione aucune différence n'est observée d'un point de vu morphologique en fonction des 3 génotypes (*tableau 8*). Le poids, la taille de la queue, la taille du corps et l'indice de masse corporel (IMC) ne montrent aucune différence.

Tableau 8 : données morphologiques de rats mâles YY, YC et CC sous régime SAFE A04 pendant 6 mois. n = 11 par groupe. Valeurs exprimées en moyenne +ET.

	YY	YC	CC
Poids (g)	465 ($\pm 53,4$)	481 ($\pm 61,1$)	462 ($\pm 53,9$)
Taille corps (cm)	26,7 ($\pm 0,707$)	26,4 ($\pm 0,768$)	26,4 ($\pm 0,741$)
Taille queue (cm)	21,0 ($\pm 0,775$)	20,9 ($\pm 1,17$)	20,6 ($\pm 1,07$)
IMC (g/cm ²)	0,653 ($\pm 0,0619$)	0,686 ($\pm 0,0628$)	0,662 ($\pm 0,0580$)

L'analyse de la courbe de poids sur 1 an ne permet pas là encore de mettre en évidence une différence entre les génotypes et cela quel que soit le stade de développement des animaux (*figure 22*). Un animal a été retrouvé mort au cours du 8^{ème} mois dans le groupe YC, mais la nécropsie réalisée a montré que la cause de cette mort n'était pas associée à un syndrome hémorragique. L'IMC compris entre 0,653 et 0,662 se situe dans la fourchette haute sans pour autant correspondre à un niveau d'obésité (Novelli et al., 2007). Ces données montrent que la mutation ne semble pas altérer la croissance normale des individus et que les conditions d'hébergement et le régime nutritionnel standard administré correspondent aux besoins nécessaires à la croissance des individus.

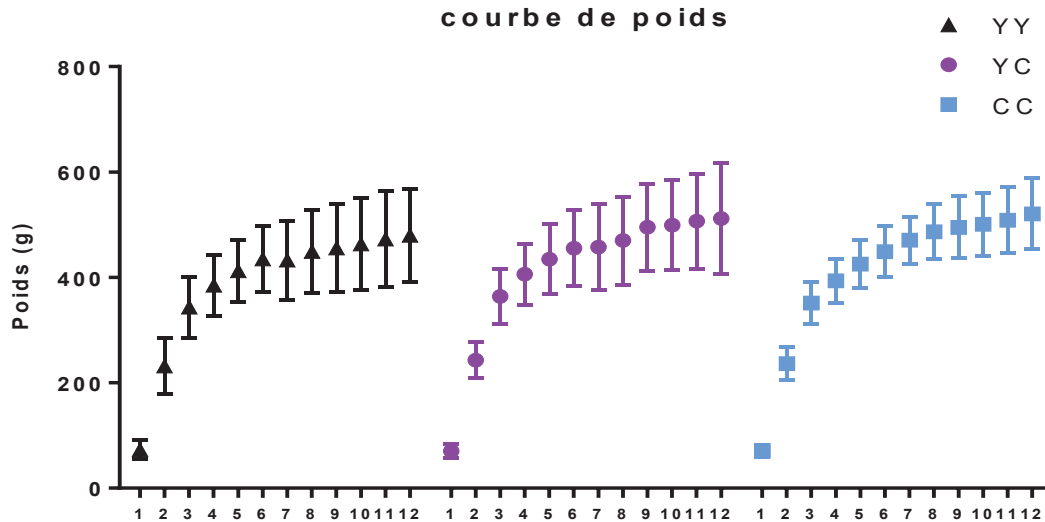


Figure 22 : Courbe de poids chez les rats mâles en fonction des 3 génotypes de *Vkorc1* (YY, YC, CC) sous régime standard avec ménadione pendant 12 mois. $n=18$ de 0 à 6 mois et $n=9$ de 6 à 12 mois ($n=17$ pour le groupe YC de 9 à 12 mois pour cause de mortalité avec absence d'hémorragie).

5.4.3 Vitamine K tissulaire

Les rats CC présentent une concentration en MK4 testiculaire diminuée de 34% par rapport aux rats YY. Une tendance à la diminution de 11% est également observée pour le groupe YC (figure 23A). La même observation est faite pour la MK4ox avec une diminution de 50% pour le groupe YY et une tendance à la diminution de 22% pour le groupe YC (figure 23B).

Ces résultats se traduisent par un ratio MK4/MK4ox 30% plus important pour le groupe CC et 15% plus importante (non significatif) pour le groupe YC comparativement au groupe YY.

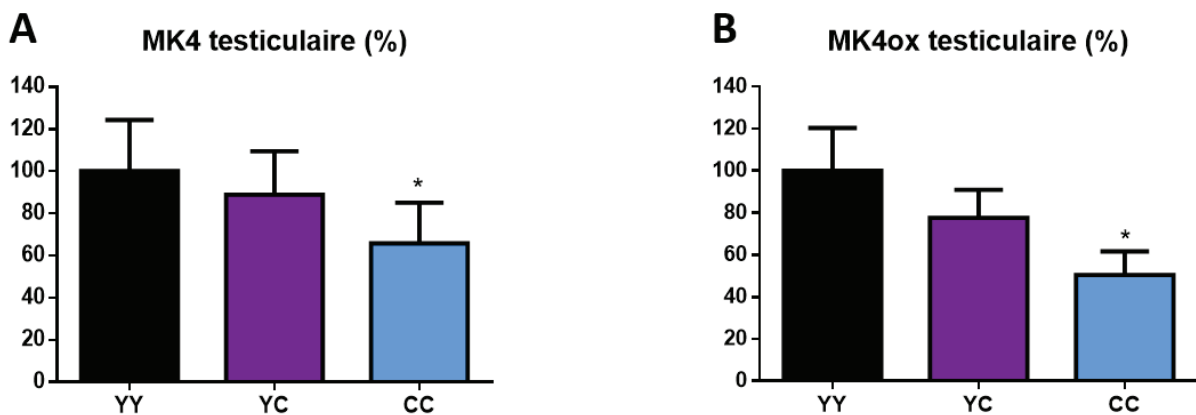


Figure 23 : MK4 (à gauche) et MK4ox (à droite) testiculaire à l'âge de 6 mois exprimée en % du groupe YY. $n = 6$ par groupe. * $P < 0,05$ avec le groupe YY.

Un recyclage moins efficace de de vitamine K dû à la mutation *Vkorc1*^{139C/139C} a déjà été observé à la fois in vivo et in vitro. Ce recyclage incomplet est associé à la production d'un métabolite inactif, la 3-hydroxy-vitamine K. Dans les populations de rats sauvages traités aux AVK le génotype hétérozygote muté YC est associé à un phénotype de résistance intermédiaire comparativement aux rats homozygotes mutés CC de phénotype résistant et homozygotes non mutés YY de phénotype sensibles. Le gène *Vkorc1* est un gène codominant et ce trait semble être confirmé en ce qui concerne le recyclage de la vitamine K. Le génotype YC montre là aussi un phénotype de recyclage de la vitamine K intermédiaire comparativement aux génotypes YY et CC.

La PK qui est présente en quantité limitée dans l'alimentation (estimation à moins de 20 µg/kg) n'est pas retrouvée dans les testicules. Contrairement à la MK4 qui peut être synthétisée par prénylation de la MD sous l'action de l'enzyme UBIAD1, la PK ne peut pas être synthétisée de novo. Son absence dans l'alimentation se traduit par une absence au niveau tissulaire. La présence de MK4 en concentration importante dans les testiculaires alors qu'elle est absente elle aussi de l'alimentation est due à la synthèse de novo par UBIAD1 en présence de MD. Ces résultats montrent clairement que la présence de la mutation Y139C abaisse le stock tissulaire de MK4.

5.4.4 Coagulation

La diminution de la teneur tissulaire basal en MK4 chez les rats YC et CC ne s'accompagne d'aucune altération de la coagulation. Le taux de prothrombine n'est pas diminué avec une activité de 100% 96,5% et 93,9% chez les rats YY, YC et CC respectivement. Cela se traduit par un temps quick normal de 14,2 (YY), 15,1 (YC) et 14,5 (CC) secondes. Les plus faibles stocks tissulaires en vitamine K chez les rats mutés restent cependant suffisantes pour couvrir les besoins en vitamine K et prévenir l'état de carence associant des syndromes hémorragiques.

5.4.5 Paramètres biochimiques plasmatiques

L'analyse plasmatique montre une glycémie est augmentée de 38,4% (YC) et de 47,0% (CC) comparativement au rats non mutés YY. La glycémie évolue très rapidement en cas de stress sous l'action de l'adrénaline. Le jour de prélèvement des organes, les rats ont été mis à mort séquentiellement par groupe de 3 en commençant par le génotype YY et en finissant par le génotype CC systématiquement. Un temps d'attente court de l'ordre de 5 minutes sépareit l'anesthésie entre 2 génotypes. Ce temps court a pu être suffisant pour générer un stress

visible au niveau de la glycémie sans que le génotype ne soit la réelle cause de cette augmentation. Les fructosamines est un témoin de la glycémie moyenne sur plusieurs semaines. Des échantillons de plasma sont encore à disposition et le dosage de ces fructosamines permettra peut-être de confirmer l'hypothèse de l'hyperglycémie due au stress ou au contraire de montrer réel impact de la mutation sur ce paramètre.

Les protéines totales sont également significativement diminuées pour le groupe CC comparativement aux groupes YY et YC.

Aucune modification des paramètres phosphocalciques (Ca et P), de l'inflammation (CRP), d'altération de la fonction rénale (Créatinine) ou hépatique (Pal/ALAT) n'ont été observés en fonction du génotype (*tableau 9*).

Tableau 9 : données plasmatiques de marqueur de l'équilibre ostéocalcique (Calcémie et phosphatémie), de la fonction rénale (créatinine), de l'inflammation (CRP), de la fonction hépatique (PAL/ALAT) et de la coagulation (temps de quick et prothrombine) chez des rats mâles YY, YC, CC âgés de 12 mois sous régime standard SAFE A04. # $p < 0,05$ avec CC, * $p < 0,01$ avec YY, * $p < 0,001$ avec YY.

	YY	YC	CC
Calcémie (mmo/l)	2.81 (± 0.186)	2.79 (± 0.131)	2.73 (± 0.092)
Phosphatémie (mmol/l)	1.90 (± 0.199)	1.81 (± 0.154)	1.68 (± 0.212)
Créatinine ($\mu\text{mol/l}$)	24.7 (± 8.69)	29.1 (± 8.13)	27.0 (± 7.11)
CRP (mg/l)	49.6 (± 4.66)	53.6 (± 4.07)	54.7 (± 7.21)
PAL (UI/l)	291 (± 150)	260 (± 75.4)	251 (± 109)
ALAT (UI/l)	86.2 (± 13.8)	84.2 (± 11.9)	73.0 (± 10.4)
Glycémie (mmol/l)	9.39 (± 1.21)	13.0 (± 1.85) **	13.8 (± 1.38) ***
Urémie (mmol/l)	6.09 (± 0.491)	6.34 (± 0.887)	6.48 (± 0.931)
Protéines totales (g/l)	70.4 (± 3.43)	67.6 (± 2.51) #	63.3 (± 1.94) **
Albumine (g/l)	32.2 (± 2.95)	31.9 (± 1.17)	30.9 (± 2.15)
Globuline (g/l)	39.4 (± 3.95)	37.9 (± 7.52)	35.7 (± 10.1)
Rapport A/G	0.824 (± 0.110)	0.863 (± 0.125)	0.906 (± 0.178)
Temps de quick (s)	14,2 ($\pm 2,6$)	15,1 ($\pm 1,8$)	14,5 ($\pm 2,1$)
Prothrombine (%)	100 (± 8.64)	96.5 (± 12.5)	93.9 (± 6.99)

5.4.6 Calcium tissulaire

Aucune augmentation du calcium dans l'aorte n'est observée à l'âge de 6 mois quel que soit le génotype et cette même constatation est faite à l'âge d'un an au niveau de l'aorte et des autres différents organes (tableau 10). Les colorations de von-kossa dans les différents organes viennent confirmer l'absence de calcification dans les 3 génotypes.

Tableau 10 : Calcium tissulaire en µg/g à l'âge de 6 mois et de 12 mois avec un régime standard SAFE A04. Résultats en fonction des 3 génotypes YY YC et CC. n = 9 par groupe.

Tissus	Agés (mois)	YY	YC	CC
Aorte	6	357 (±66,5)	338 (±100)	401 (±157)
Aorte	12	429 (±111)	478 (±130)	478 (±205)
Foie	12	244 (±31,7)	231 (±36,0)	218 (±46,4)
Reins	12	786 (±228)	788 (±195)	857 (±267)
Cœur	12	331 (±42,8)	325 (±30,1)	308 (±31,4)
Poumons	12	786 (±228)	788 (±195)	857 (±267)
Testicules	12	341 (±66,8)	352 (±52,5)	343 (±38,1)

L'ensemble de ces résultats permet de montrer qu'en condition normale d'hébergement et sous un régime standard les rats homozygotes CC et hétérozygotes YC se développent de manière similaire au rats YY malgré un statut basal en vitamine K diminué. Cette plus faible teneur en vitamine K n'étant ni associé à des troubles de la coagulation ni à des altérations de l'équilibre phosphocalcique, il semble que les besoins en vitamine K soient complètement assurés par ce régime.

5.5 Conclusion

Cet objectif a permis de montrer que les paramètres relatifs à l'équilibre phospho-calciques, à la reproduction et à la croissance des rats mutés CC de la lignée C139 (issue de l'introgession sur 10 générations de rats VKORC1^{Y139/C139} * Sprague-Dawley) sont comparable aux rats non mutés YY. La mutation du gène VKORC1 responsable de la résistance chez ces rats à l'état naturel n'entraîne donc pas de modifications lorsque ces animaux sont élevés en condition normale d'hébergement avec une alimentation standard. Seule la teneur basale en vitamine K est légèrement diminuée, mais elle n'est pas accompagnée d'autres observations. Les mâles sont plus susceptibles que les femelles à la carence en vitamine K et aux traitements aux AVK. À la vue de ces éléments, les besoins en vitamine K devraient également être assurés chez la femelle CC bien que cet aspect n'ait pas été évalué.

La lignée C139 a été caractérisée et les 3 génotypes issus de cette lignée peuvent être utilisés pour étudier l'impact d'une carence en vitamine K pour la suite du projet.

6 OBJECTIF 2 : EVALUATION DU MODELE DE SUBCARENCE EN VITAMINE K DE LA LIGNEE C139

6.1 Objectifs

Ce deuxième objectif était l'élément central de ce travail de thèse puisqu'il s'agissait d'évaluer l'impact d'une subcarence en vitamine K de plusieurs semaines chez le rats CC sur le développement de calcifications vasculaires. L'apparition de ces calcifications a été caractérisée dans différents tissus, en fonction du génotype, du sexe, et du temps de carence. L'ensemble des résultats observés dans ce 2^{ème} objectif ont permis d'établir les bases d'un nouveau modèle d'étude des calcifications vasculaires chez le rat.

6.2 Méthodes

Des rats mâles et femelles CC et YY âgés de 5 semaines ont été nourris soit avec le régime standard A04 avec ménadione soit avec le régime A04 sans ménadione pendant plusieurs semaines. Après cette période de régime les différents organes (foie, rein, cœur, poumons, testicules, aorte) ont été prélevés et les calcifications ont été évaluées d'un point de vue quantitatif et qualitatif. Parallèlement à la caractérisation de ces calcifications, la coagulation, l'expression de différents transcrits impliqués dans le cycle de la vitamine K ainsi que la teneur en vitamine K testiculaire ont également été explorées.

6.3 Résultats résumés

Les différentes études menées dans cet objectif ont permis de montrer que seules les rats CC exposés au régime sans ménadione pendant plusieurs semaines présentaient des calcifications vasculaires. Ces calcifications sont beaucoup plus importantes chez le mâle que chez la femelle. Ces calcifications sont localisées au niveau du tissu vasculaire des différents organes. Les testicules est l'organe qui calcifie le plus avec l'apparition de calcifications importantes dans les artères testiculaires visibles par coloration de von-kossa et en μ CT. Le foie qui présente une élévation significative de la concentration en calcium ne présente cependant pas de calcifications observables. Ces calcifications augmentent avec la durée du

temps de régime et s'accompagnent d'une forte diminution tissulaire en vitamine K (<1% de l'état basal).

La concentration en ucMGP est augmentée dans les tissus des animaux calcifiés et la cMGP est diminuée. Ces résultats semblent indiquer que les calcifications sont provoquées par une incapacité de la MGP à jouer son rôle naturel d'inhibiteur des calcifications vasculaires.

Les rats mâles CC sans ménadione présentent une diminution de leur activité en facteur II qui peut s'accompagner d'une légère augmentation du temps de quick. Cette diminution ne s'accompagne d'aucun signe clinique bien que quelques cas de mortalités dus à des accidents hémorragiques sont relevés au cours de la carence. Ces accidents restent cependant assez rares.

Les principaux résultats de cette partie ont fait l'objet d'un article soumis dans le journal « Scientific Report » sous le titre « Missense mutation of *VKORC1* leads to medial arterial calcification *VKORC1*-C139 mutant rat as a model for medial arterial calcification ». Cet article est présenté dans la section suivante.

Les autres résultats qui n'ont pas pu être inclus dans l'article sont détaillés dans la partie « autres résultats ».

**Missense mutation of *VKORC1* leads to medial arterial calcification
- *VKORC1*-Y139C mutant rat as a model for medial arterial
calcification**

Arnaud Michaux¹, Benjamin Matagrín¹, Jean-Valéry Deboux¹, Leon J. Schurgers², Etienne Benoit¹, Virginie Lattard^{1,*}

¹, USC 1233 RS2GP, INRA, VetAgro Sup, Univ Lyon, F-69280, Marcy l'Etoile, France

², Department of Biochemistry, Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM), Maastricht University, Maastricht, The Netherlands

Running title: *VKORC1* mutation and medial arterial calcification

* Corresponding author

Dr Virginie Lattard

USC 1233 INRA-VetAgro Sup, 69280 Marcy l'Etoile, France

Phone: +33-(0)4 78 87 27 27 ; Email: virginie.lattard@vetagro-sup.fr

Keywords: vascular calcification, Vitamin K epoxide reductase, vitamin K, vitamin K antagonist, resistance, animal model

Abstract

Vitamin K plays a crucial role in the regulation of vascular calcifications by allowing activation of matrix Gla protein. The dietary requirement for vitamin K is low because of an efficient recycling of vitamin K by vitamin K epoxide reductase (*VKORC1*). However, decreased *VKORC1* activity may result in vascular calcification. More than 30 coding mutations of *VKORC1* have been described. While these mutations have been suspected of causing anticoagulant resistance, their association with an increase in the risk of vascular calcification has never been considered. We thus investigated functional cardiovascular characteristics in a rat model mutated in *VKORC1*. This study revealed that limited intake in vitamin K in mutated rat induced massive calcified areas in the media of arteries of lung, aortic arch, kidneys and testis. Development of calcifications could be inhibited by vitamin K supplementation. In calcified areas, inactive Matrix Gla protein expression increased, while corresponding mRNA expression was not modified. Mutation in *VKORC1* associated with a limited vitamin K intake is thus a major risk for cardiovascular disease. Our model is the first non-invasive rat model that shows spontaneous medial calcifications and would be useful for studying physiological function of vitamin K.

INTRODUCTION

Vascular calcification is a pathology related to age which affects most people over 60 years. It is characterized by deposits of hydroxyapatite crystals in the media and/or intima of the arterial walls. This calcification can lead to complications like high blood pressure or heart failure which are major risk factors for cardiovascular disease. Calcification is accelerated by inflammation, diabetes, chronic kidney disease (CKD), osteoporosis or vitamin K antagonist treatment like warfarin¹. It is widely accepted that vascular calcification is not the consequence of a passive phenomenon but is regulated by complex active mechanisms¹, especially vitamin K-dependent mechanisms. It has been demonstrated that vitamin K plays a crucial role in the regulation of ectopic calcifications by either holding progression or even reversing vascular calcification². Vitamin K is an essential co-factor for the gamma-glutamyl-carboxylase enzyme, which is responsible for activation of 17 vitamin K-dependent proteins (VKDP) by gamma-carboxylation of their glutamate residues. Carboxylation confers these so-called vitamin K-dependent proteins (VKDP) the ability to bind calcium. Among these proteins, factors II, VII, IX and X are involved in the coagulation process. Extrahepatic VKDP such as matrix-Gla-protein (MGP), osteocalcin or Gla-rich protein³ are involved in bone and calcium metabolism. MGP, when carboxylated, is a potent inhibitor of vascular calcification and knockout of the MGP gene in mice results in premature death by spontaneous calcification of arteries⁴.

Despite the conversion of vitamin K in vitamin K epoxide by the gamma-glutamyl-carboxylase to activate VKDP, the daily requirements for vitamin K in normal adult are low with recommendations for the different countries comprised between 50 to 120 µg/day/adult⁵. The low requirement can be explained by an efficient recycling system of vitamin K from vitamin K epoxide by the vitamin K epoxide reductase enzyme (VKORC1) allowing the use of vitamin K for some 500 carboxylation reactions⁶.

Failure in the reduction of vitamin K epoxide by VKORC1 may result in loss of inhibition of vascular calcification and thus may cause accelerated vascular calcification. Reduction in VKORC1 activity results from the daily use of anticoagulant therapy with vitamin K-antagonists to prevent and treat thromboembolic disorders⁷. It is now accepted that the long-term use of anticoagulant induces vascular calcification^{8,9,10,11,12,13,14}. Additionally, experimental studies in rats and mice have clearly shown that inhibition of VKORC1 by warfarin induces medial calcification of the arterial vessel wall^{15,16,17}.

This reduction in VKORC1 activity may also result from sequence variations of the *VKORC1* gene. 5 common non-coding polymorphisms of the *VKORC1* gene have been identified in patients requiring lower doses of warfarin, including polymorphisms in the promoter region, in the first and second intron, and in the 3' downstream region^{18,19,20}. Since the presence of these polymorphisms is associated with reduced expression of VKORC1²¹, clinical studies have attempted to link these polymorphisms to an increased risk of vascular calcification. The results thus far are conflicting and do not allow a conclusion^{20,22,23,24,25,26}. More than 30 mutations in the coding region of VKORC1 have also been described in patients requiring increased doses of anticoagulants²¹. While these mutations have been widely suspected of causing anticoagulant resistance, their association with an increase or decrease in the risk of vascular calcification has never been considered. However, some of these mutations, such as mutations at amino acid 139²⁷, are localized in the substrate binding site and may induce a decrease in activity of VKORC1. The objective of this study is to study the impact of such mutation in the development of vascular calcifications by using a rat model carrying a mutation of *VKORC1* at position 139.

RESULTS

The genotype of F10-introgressed rats did not result in phenotype modification

From 41 crosses with heterozygous F10-introgressed rats, 35 litters were obtained comprising the 3 different genotypes YY, YC, CC with a distribution of Mendelian type in terms of sex and genotype. At the age of 2 months, 11 males and females of the same

genotype were mated. The average duration between presentation of the male to the female and the birth of the pups was 24.7 (\pm 1.01), 25.5 (\pm 1.04) and 24.46 (\pm 0.93) days respectively for the crossing YY*YY, YC*YC and CC*CC. The litter size was 11.9 (\pm 2.39), 13.1 (\pm 2.21) and 12.6 (\pm 2.88) for the YY*YY, YC*YC and CC*CC crossings. The morphological aspect and the weight of the pups from the different crosses were not differentiable at the time of weaning at the age of 30 days. To eventually detect phenotypic variations between genotypes, 9 male rats of each genotype fed with a standard diet were observed for 12 months. During this period, 1 single YC genotype rat was found dead at the age of 9 months. Necropsy analysis of this rat did not reveal any sign of hemorrhage. None of the other rats exhibited bleeding or increased prothrombin time during this period. The weight gain was not significantly different between genotypes throughout the duration of the diet with a 12-month weight of 480 (\pm 88.4), 511 (\pm 104.6), 520 (\pm 67.6) grams for YY, YC and CC groups respectively (Suppl. figure 2). Plasma urea, creatinine, calcium and phosphate concentration were not affected by the genotype and mean values are reported in Table 1.

Feeding of F10-introgressed rats for 12 weeks with a special diet-K3 did not result in morphological, coagulation or biochemical plasma modifications whatever the genotype was.

After receiving 12 weeks of special diet -K3 *ad libitum* just after the weaning, the average weight of YY or CC rats was 357 \pm 22 grams and 320 \pm 50 grams and weights were not statistically different between genotypes (Table 1). The vitamin K deficiency led to the death of two animals CC^{-K3} out of twelve. Necropsy analysis of these rats revealed the presence of large blood clots localized at the chest and abdomen. The mean prothrombin time of CC^{-K3} group was only increased by 5.3 seconds compared to group YY^{+K3} (Figure 1A). Along with this slight increase in prothrombin time, activity of clotting factor II was reduced by 41.9 % in the group CC^{-K3} vs YY^{+K3} (Figure 1B). No uremia, creatininemia, calcemia and phosphatemia was induced by the feeding with the special diet -K3 (Table 1).

CC rats receiving a specific diet -K3 for 12 weeks present tissue-calcifications

To take an overall view, development of extraosseous calcification was first analyzed by μ CT in the four target zones (lung, aortic arch, kidneys and testis) from one individual from each group of rats (i.e., YY or CC rats) which had received either a normal diet or a specific diet -K3. Calcification zones were detected in the lung, aortic arch and testis of the CC^{-K3} rat whereas the other rats YY^{+K3}, YY^{-K3} and CC^{+K3} did not show calcification in these regions (Figure 2). High-vitamin K intake (K₁ or K₃) given in CC rats all along the feeding period with diet-K3 weeks prevented the observation of calcification zones in lung, aortic arch and testis. After acquisition of images by μ CT scanning, 3D-representations were made to represent calcifications within target regions in CC^{-K3} rat and calculate the global volume occupied by these calcifications. In lungs, the areas of calcification were mainly observed in the pulmonary vessels, as shown by the μ CT axial view (Figure 2B). The three-dimensional representation of the lung enables to estimate the volume of these calcifications at \sim 3.4 mm³. In the aortic arch, the volume of calcifications was estimated at 1.2 mm³. The most significant areas of calcification were observed in the right and left testis of the CC^{-K3} rat, with volumes of 63.2 mm³ and 60.5 mm³, respectively. These calcifications appeared to be inside the testicular blood vessels. The small volumes detected in testis of rats belonging to the other groups were only due to the presence of artifacts related to the presence of tail bones near the target region. In kidney, no calcification was visualized by μ CT whatever the group of rats considered.

To precisely compare calcification process according to the genotype, age and diet, tissue calcium concentration was determined in YY, YC and CC rats. No modification of calcium contents in liver, heart, lung, kidney, aorta and testis was detected between genotypes in one year-old rats fed with standard diet for 12 months (Table 2). On the contrary, rats fed with special diet -K3 for 12 weeks after the weaning, difference in calcium contents were

detected between genotype in 4 months-old rats. In the CC^{-K3} group, calcium concentration was significantly increased in all tissues observed compared to the 3 other groups (Figure 3). This increase was 2.8 times higher in liver, 2.5 times in heart, 3 times in lung and 7.1 times in testis compared to the YY^{+K3} group. A 51% increase in calcium concentration in the liver was also observed in the group CC^{-K3} compared to the group CC^{+K3}.

Tissue-calcium deposits are located in the medial layer of arteries

Von Kossa staining did not allow to detect calcium deposit in the different organs (i.e., kidney, lung, testis and aortic arch) obtained from YY^{+K3}, YY^{+K3}, CC^{+K3} (Figures 4). On the contrary, feeding for 12 weeks with vitamin K₃ deficient diet of CC rats resulted in significant calcifications in lung and testis (Figure 4). These calcifications were present in 100% of the samples and were localized in the media of lung and testicular arteries. Some calcifications were also observed in the media of arteries located in the renal hilum (6 samples positives on 10) (Figure 4) and in the media of the aortic cross (3 samples positives on 10) (Figure 4) in these animals. A moderate to severe destructure in the proximal aorta of CC^{-K3} rats with alteration of elastin fibers was visible in orcein staining, while no alteration of the elastin fibers was found with a standard regime in the CC^{+K3} group (Figure 4E). No calcium deposit was detected in the liver of CC^{-K3} rats.

Calcification staining is positively correlated with immunohistochemical ucMGP staining

To investigate matrix Gla protein in relation to calcification of vascular tissue, MGP mRNA level was quantified in testis, lung and kidney according to the genotype and diet. mRNA expression of MGP was not significantly different in CC-K3 compared to other groups in any of the tissues analysed (data not shown).

Subsequent staining with conformation-specific antibodies against ucMGP (Suppl figure 3) revealed high staining in heart, kidney and testis of CC rats fed with diet -K3, whereas low staining was detected in other groups (Figure 5). Moreover, addition of vitamin K1 or vitamin K3 during the feeding period with diet -K3 prevented increased ucMGP presence. These immunohistochemical stainings enabled to establish a positive correlation between Von kossa staining and ucMGP staining (Figure 5D), suggesting that a limited intake of vitamin K in CC rats led to calcification phenotype by inhibiting carboxylation of MGP.

DISCUSSION

The results presented herein clearly demonstrate the development of extensive medial arterial calcifications in CC rats when these rats are fed with a diet -K3. To induce this phenotype, the association of two determining factors is strictly required: 1/ a limited vitamin K intake in the diet, and 2/ the presence of the p.Y139C mutation in the *VKORC1* gene. Indeed, CC rats fed with a standard diet did not develop any arterial calcification throughout the observation period while the same rats fed with diet -K3 developed extensive arterial calcifications. Of note, the diet -K3 used in this study differs from the standard diet by the absence of supplementation in vitamin K3, but also by a different composition. The barley rich in vitamin K1 was replaced by corn starch. In order to prove the dependence of the observed phenotype on the vitamin K intake, daily vitamin K3 or K1 supplementation was performed in CC rats fed with diet -K3. No arterial calcification could be detected in these animals, which proves the unequivocal role of vitamin K in vascular calcification.

The presence of the p.Y139C mutation in the *VKORC1* gene is also a fundamental factor in the development of these arterial calcifications. In YY rats, a limited intake of vitamin K did not induce development of medial arterial calcifications or an increase in tissue calcium concentrations. Consequently, in these rats, despite a limited dietary intake of vitamin K, the efficient recycling of vitamin K by *VKORC1* enzyme together with the production of vitamin K by the microflora ensures the vitamin K requirements that are necessary for activation of VKDPs involved in the inhibition of tissue calcification. This balance seems to be completely disturbed in CC rats. Indeed, in these rats, a limited dietary intake of vitamin K results in the development of massive and disseminated arterial calcifications. The presence of aortic and

renal ectopic vascular calcifications in wild rats homozygous for Y139C mutation trapped in the field had been previously described by Kohn et al²⁸. Nevertheless, because these rats were wild rats trapped in the field, it was difficult to draw conclusions since the genetic background could not be controlled. These rats were at least carriers for the p.Y139C mutation in the *VKORC1* gene, but these rats could also carry other point mutations in the rest of their genome. In addition, because these rats were wild rats, their microflora could be altered and the development of calcifications could be due to this alteration. In fact, sterilization of microflora in laboratory rats or mice receiving a limited intake of vitamin K has been shown to induce the development of arterial calcifications^{29,30}. The Y139C mutation into a laboratory rat genome according to the introgression protocol performed in this study enables to demonstrate without ambiguity the involvement of the Y139C mutation in the observed phenotype. Indeed, even if a wild rat carrying the Y139C mutation was initially used to generate the introgressed rat strain, the successive introgression over 10 generations of the Y139C mutation in Sprague Dawley rats allows us to exclude the involvement of other points mutations. Such an introgression protocol had already been applied to evaluate the consequences of another mutation of *VKORC1*, the Y139F mutation. After 9 generations (i.e., one less than for this introgression), the size of the introgressed chromosome fragment in the laboratory rat genome was estimated to be less than 28 Mb (i.e., less than 1 tenth of the whole chromosome 1)³¹. In this experiment, because we used one supplementary generation, the size of the introgressed fragment is probably even lower. A different composition of the intestinal microflora between the genotypes also seems totally excluded because of the protocol. Indeed, after 10 generations of backcrossing between heterozygous rats from the previous generation and Sprague Dawley rats, an intercross between F10 heterozygous males and females was performed to generate the different genotypes (i.e., YY rats and CC rats). The composition of their intestinal microflora between genotypes is thus undoubtedly identical and cannot be responsible for the difference in phenotype. The phenotype observed (i.e., the sensitivity of the arterial media to calcification induced by a limited intake of vitamin K) is thus associated to the Y139C genotype.

Mutations in the *VKORC1* gene are usually considered as linked to resistance to anticoagulants either in humans³² or in rats³³. Y139C mutation results in a strong resistant to anticoagulant such as warfarin. Nevertheless, this mutation also induces a decrease in the efficiency of the *VKORC1* enzyme to recycle vitamin K. It has been shown that the catalytic efficiency of the *VKORC1* Y139C protein is reduced by a factor of 20³⁴. This altered recycling of vitamin K is further aggravated by the fact that the Y139C mutation leads to change in the catalysis of vitamin K epoxide by *VKORC1* and one third of the vitamin K epoxide is converted into 3-hydroxyvitamin by the mutated *VKORC1* instead of being recycled to vitamin K³⁴. Loss of vitamin K as 3-hydroxyvitamin K associated with inefficient recycling is undoubtedly responsible for additional vitamin K requirements that cannot be covered by intestinal microflora production. These increased vitamin K requirements in rats with mutations in the *VKORC1* gene have been suggested by earlier studies^{35,36} and results obtained in this study confirm these observations.

In humans, nearly 30 coding mutations of *VKORC1* have been detected in patients requiring increased doses of anticoagulants. Among these almost 30 mutations, 16 result in a very strong decrease of the efficiency of *VKORC1* to recycle vitamin K³² even though characterizations of catalytic properties of mutants have been sometimes conflicting^{37,38}. It is thus probable that some of these mutations are associated with higher vitamin K requirements. However, the frequency of these mutations has never been considered in people with medial arterial calcification and studies to reveal such association should be considered. Moreover, it has been described that CKD is often associated with a vitamin K deficiency. This deficiency is only partially understood. Reduced vitamin K intake³⁹ and reduction of *VKORC1* expression¹⁶ have been suggested. The frequency of mutations of the *VKORC1* gene in CKD patients with deficiency in vitamin K could also be considered as risk factor for vitamin K deficiency.

After 3 months of diet -K3, all the CC rats present medial arterial calcifications. Clear calcifications are detected in lung and aortic cross by μ CT. Such calcifications have been

already observed in rats receiving high dose of warfarin¹⁵. Surprisingly, severe and extensive calcifications are also observed by μ CT in testis of all CC rats receiving limited intake of vitamin K. In this study, testis seems a tissue particularly sensitive to medial arterial calcification induced by vitamin K deficiency. Vitamin K concentrations have been reported to be particularly high in testis of rats maintained under normal feeding conditions compared to other tissues⁴⁰, which is consistent with the high sensitivity of this tissue to vitamin K deficiency shown herein. This susceptibility had never been reported until now, even in the warfarin-mediated calcification model¹⁵. It is possible that the strong expression of VKORC1L1 in testis⁴¹, a paralogue enzyme of VKORC1 able to recycle vitamin K as VKORC1, but unlike VKORC1 highly resistant to warfarin⁴¹, preventing the development of vitamin K-dependent medial arterial calcification when warfarin is used. The other tissues considered in this study appear less sensitive to medial arterial calcification and detection techniques more sensitive than μ CT are necessary to highlight them.

These media arterial calcifications are most likely due to the absence of gamma-carboxylation of MGP. Indeed, a positive correlation was systematically found between accumulation of calcium and accumulation of undercarboxylated MGP. The crucial function of MGP in the calcification process⁴² is accepted and absence of activation of MGP due to vitamin K deficiency can easily explain the development of medial arterial calcification in CC rats (Figure 6). Surprisingly, while MGP is not gamma-carboxylated in CC rats fed with a diet -K3, activation of clotting factors by gamma-carboxylation seems to be poorly impacted.

Animal models of vitamin K deficiency to study medial arterial calcifications are lacking. Indeed, experimental vitamin K deficiency can be obtained using synthetic diets. In this case, absence of vitamin K dietary intake can cause drastic decrease in activated clotting factors and leads to hemorrhagic syndrome^{43,44}. Rats treated with warfarin (100 mg/kg/day)¹⁵ present arterial calcifications only in growing animals but less in older, non-growing animals. Moreover, the dosage necessary to induce calcification appears to be pharmacological high and implies the use of large amount of vitamin K1 to avoid a lethal hemorrhagic syndrome. A recent rat model using adenine in order to create uremia appears to be interesting because the use of vitamin K1 is not necessary⁴⁵, but this model does not allow to observe microscopy detectable calcifications. CC rats might be an interesting model to study vitamin K deficiency in relation to medial arterial calcifications. When CC rats are maintained with standard diet with vitamin K3, they do not present any calcification, reproduce and grow normally, and have no coagulation disorders and no biochemical changes. Implementation of this model does not involve any invasive action, it is based only on giving to CC rats a normal diet not supplemented with vitamin K3. In this way, mortality by hemorrhage is extremely rare and development of medial arterial calcifications is reproducible and systematic. In conclusion, our model is the first non-invasive rat model that shows spontaneous medial calcifications. Our model could also be crucial for studying the physiological importance of vitamin K.

METHODS

Animals

Wild rats *Vkorc1*^{C139/C139} strain, carrying the Y139C mutation in *Vkorc1* at the homozygous state, was a generous gift from Julius Kuhn Institute. The founder animals of this strain were initially trapped in Germany. F10-introgressed rats homozygous for C139, F10-introgressed rats homozygous for Y139 or F10-introgressed rats heterozygous were derived from backcrossings and intercrossings between Sprague-Dawley rats (designed as recipient strain) (Charles River, St Germain sur l'Arbresles, France) and rats from wild rats VKORC1^{C139/C139} strain (designed as donor strain for the Y139C mutation) (Suppl figure 1). To form congenic strains, four male wild rats VKORC1^{C139/C139} were crossed with four Sprague-Dawley females to create the F1 hybrid generation, respectively. The F1 heterozygous for the Y139C mutation males were backcrossed to Sprague-Dawley females to give the F2 generation. The genotype of F2 young rats was determined by the allele-specific PCR method, as described below. Heterozygous females were backcrossed to the recipient Sprague-Dawley strain for 8 additional generations yielding F10 generation. Finally,

an F10 intercross of males heterozygous for Y139C with females heterozygous for Y139C was carried out to obtain F10-introgressed rats homozygous for Y139 (designed in this study as YY), F10-introgressed rats homozygous for C139 (designed in this study as CC), and F10-introgressed rats heterozygous for Y139C (designed in this study as YC).

Animals were kept in standard cages (Eurostandard, Type IV, Tecniplast, Limonest, France), with a day-night cycle 12h/12h and received water and in standard condition, standard feed containing vitamin K₃ (Scientific Animal Food and Engineering, reference A04) (designed in this study as diet +K₃), both *ad libitum*.

Genetic characterization of animals

Genomic DNA was extracted from tail using the Extracta™ DNA Prep for PCR – Tissue extraction kit (Quanta, Biosciences). The allele-specific PCR method employed two pairs of primers purchased from Eurogentec (Angers, France). The forward primer was one of the two primers which the three prime nucleotide of the first one matched the *Vkorc1* sequence of the SD strain (i.e. the rat genome sequence of *Vkorc1*; VKORC1^{Y139/Y139}-primer: 5'-CATTGTTTGCATCACCACCTA-3') and the three prime nucleotide of the other matched the mutation in the *Vkorc1* sequence of the donor strain (VKORC1^{C139/C139}-primer: 5'-CATTGTTTGCATCACCACCTG -3'). The reverse primers matched the *Vkorc1* sequence of the rat genome sequence for the *Vkorc1* (5'- TCAGGGCTTTTGGACCTTGTG -3'). We amplified 135 base pairs of *Vkorc1* gene using quantitative real-time PCR (qPCR) in a Thermocycler Mx3000P Stratagene (Massy, France). The reaction mixture contained 5X HOT BIOAmp EvaGreen (Biofidal, Vaulx-en-velin, France) qPCR Mix (no ROX). The 15 µL reactions contained 1µL of genomic DNA, 0.5pmol/µL of each forward and reverse primers, 5x EvaGreen qPCR buffer including dNTPs, HOT BIOAmp DNA polymerase, MgCl₂ at 12.5mM, EvaGreen dye. The cycling was initiated by one denaturation step at 95°C for 5 min; followed by 40 cycles of [95°C for 15s (denaturation), 64°C for 20s (annealing step) and 72°C for 20s (elongation) each]. Fluorescence from both the evagreen dyes was recorded at the annealing step. The point at which the PCR product is first detected above a fixed threshold, the thermal cycle threshold (C_t), was determined for each sample in duplicate, and the average C_t of duplicate sample was calculated. The three possible genotypes YY, YC and CC were deduced from the differences between their characteristic cycle threshold values (ΔC_t). That is difference of C_t values between the matched and the mismatched primer extension for homozygous rats, and the absence of such a difference in C_t values for heterozygous animals.

Animal treatment

Experimental research on animals was performed according to an experimental protocol following international guidelines and with approval from the ethics committee of the Veterinary School of Lyon. During vitamin K deficiency experiments, 4 weeks old animals received just after weaning and for 12 weeks a diet deficient in vitamin K₃ (menadione) without barley (Scientific Animal Food and Engineering, SAFE A04 v231) (designed in this study as diet -K₃) *ad libitum*. This diet was composed of corn starch 36.1% (instead of barley rich in vitamin K₁), wheat 25%, corn 15%, wheat bran 5%, peanut oil 3%, soybean meal 8%, fish hydrolyzate 4% and minerals / vitamins mix 3.9% (without vitamin K₃).

In addition, all along the feeding period with the special diet -K₃, some animals received menadione bisulfite supplied in the drinking water (200 mg/L of water) which was available *ad libitum*, other animals received daily subcutaneous injections of phylloquinone (10 mg/kg). Finally, rats were anesthetized with isoflurane and blood was taken by cardiac puncture into citrated heparin lithium tubes. Finally, rats were euthanized with CO₂ and organs (liver, kidney, lung, heart and testis) of each rat were immediately collected and stored at -20°C or fixed in a solution of 4% formaldehyde (Microm Microtech, Brignais, France) until analysis.

Coagulation measurements

After blood collection into citrated tubes, blood samples were centrifuged at 3000g for 10 minutes and plasmas were used immediately for prothrombin time determinations.

The prothrombin time was determined from 100µl of fresh citrated plasma and 200µl of thromboplastin (Neoplastin CI, INR Determination kit, Diagnostica Stago, Asniere, France) using a Biomerieux Option 2 plus (Behnk Electronick, Norderstedt, Germany) according to the manufacturer's recommendations.

Vitamin K-dependent clotting factor II activity was measured on citrated plasma using a chromogenic method on Konelab 20 (Thermofisher, Cergy Pontoise, France) with Hyphen Biomed reagents. Factor II was activated by incubation of citrate plasma with Echis Carinatus venom (0.25 mg/mL) in Tris-buffer (0,1mM Tris Hcl, pH 8.3 at 25°C, 0.2% BSA) at 37°C for 10 min. Thus, 50 µg of thrombin chromogenic substrate was added and absorbance was monitored at 405 nm for 1 min.

Biochemical parameters measurements

After blood collection in heparin lithium tubes, blood samples were centrifuged at 3000g for 10 minutes and plasmas were frozen at -80°C for biochemical determinations

Biochemical parameters were determined from thawed plasma using a chromogenic method on Konelab 20 (Thermofisher, Cergy Pontoise, France) with specific reagents (Termo Fisher Diagnostics, Dardilly, France).

Micro-CT analysis

The µ-CT acquisitions were carried out after euthanasia of the animals by lethal injection of pentobarbital, under isoflurane anesthesia. Three successive periods of acquisition were performed, each period was performed to detect calcifications in specific regions. The first region of interest included lung, aorta and aortic arch regions; the second one, kidneys; the third one, testes. Acquisitions were made with a field of view of 80 mm diameter and 35 mm depth and a pixel size and a layer thickness of 90 µm. A manual segmentation was then performed around each target region (lung/aortic arch/aorta, kidneys and testes). The natural densities of these 4 region of interests being intrinsically different, different thresholds have been set for the segmentation of calcified areas, in order to exclude soft tissue in the quantization. Therefore, different sensitivity was applied for the detection of calcifications for each organ (50 HU for the lungs and kidneys (highest sensing zone, 25 HU for the aortic arch area aorta (intermediate sensing zone) and 30 HU per testis (lowest sensitivity zone).

Volume of calcifications observed in the 4 target regions was then calculated. In some regions of interest, artefacts due to the presence of bone density were detected. These artifacts were not taken into account in the final calculation of calcification volumes.

Tissue calcium measurements

Tissues were placed in an oven at 50 ° C for 72 h then reduced to a powder using a glass mortar. Calcium was extracted from 10 to 50 mg of tissue powder (depending to the organs) in 200 µl to 1 ml of a 10 % formic acid solution for at least 2 hours. The supernatant was recovered after centrifugation at 3000g for 10 minutes and then evaporated at 110°C. Residues were resuspended with mili-Q water corresponding to half of the volume of the formic acid solution Calcium was assayed using the calcium colorimetric assay kit, (Sigma-Aldrich, l'Isle d'Abeau, Chesnes, France) according to the manufacturer's recommendations.

Histology study

Tissues were fixed at least 48 hours in a 4% formaldehyde solution prior to being embedded in paraffin. Von Kossa and hematoxylin & eosin staining were subsequently carried out on 3.5 µm thick sections.

Images of sections were obtained using an Olympus microscope BX50 (Olympus, France) mounted with a Coolpix 4500 camera (Nikon, France). Pictures were treated using eclipsnet software (version 1.20.0).

Data analysis

Data are presented as the mean±SD. Statistical analysis was done by using the Tukey's multiple comparisons test, using GraphPad Prism 6 software (GraphPad, San Diego, CA,

USA). $P < 0.05$ was the accepted level of significance. Statistic difference was reported when only a unique variable between groups was modified (either genotype or diet).

REFERENCES

1. Leopold, J. A. Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification. *Trends Cardiovasc. Med.* **25**, 267–274 (2015).
2. Schurgers, L. J. *et al.* Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood* **109**, 2823–2831 (2007).
3. Viegas, C. S. B. *et al.* Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 399–408 (2015).
4. Luo, G. *et al.* Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* **386**, 78–81 (1997).
5. Shearer, M. J., Fu, X. & Booth, S. L. Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements: current concepts and future research. *Adv. Nutr. Bethesda Md* **3**, 182–195 (2012).
6. Chatrou, M. L. L., Reutelingsperger, C. P. & Schurgers, L. J. Role of vitamin K-dependent proteins in the arterial vessel wall. *Hamostaseologie* **31**, 251–257 (2011).
7. Oldenburg, J., Marinova, M., Müller-Reible, C. & Watzka, M. The vitamin K cycle. *Vitam. Horm.* **78**, 35–62 (2008).
8. Koos, R. *et al.* Relation of circulating Matrix Gla-Protein and anticoagulation status in patients with aortic valve calcification. *Thromb. Haemost.* **101**, 706–713 (2009).
9. Lerner, R. G. *et al.* Warfarin use and the risk of valvular calcification. *J. Thromb. Haemost.* *JTH* **7**, 2023–2027 (2009).
10. Villines, T. C., O'Malley, P. G., Feuerstein, I. M., Thomas, S. & Taylor, A. J. Does prolonged warfarin exposure potentiate coronary calcification in humans? Results of the warfarin and coronary calcification study. *Calcif. Tissue Int.* **85**, 494–500 (2009).
11. Palaniswamy, C., Sekhri, A., Aronow, W. S., Kalra, A. & Peterson, S. J. Association of warfarin use with valvular and vascular calcification: a review. *Clin. Cardiol.* **34**, 74–81 (2011).
12. Weijs, B. *et al.* Patients using vitamin K antagonists show increased levels of coronary calcification: an observational study in low-risk atrial fibrillation patients. *Eur. Heart J.* **32**, 2555–2562 (2011).
13. Rennenberg, R. J. M. W. *et al.* Chronic coumarin treatment is associated with increased extracoronary arterial calcification in humans. *Blood* **115**, 5121–5123 (2010).
14. Schurgers, L. J., Aebert, H., Vermeer, C., Bültmann, B. & Janzen, J. Oral anticoagulant treatment: friend or foe in cardiovascular disease? *Blood* **104**, 3231–3232 (2004).
15. Price, P. A., Faus, S. A. & Williamson, M. K. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 1400–1407 (1998).
16. McCabe, K. M. *et al.* Dietary vitamin K and therapeutic warfarin alter the susceptibility to vascular calcification in experimental chronic kidney disease. *Kidney Int.* **83**, 835–844 (2013).
17. Schurgers, L. J. *et al.* Vitamin K-antagonists accelerate atherosclerotic calcification and induce a vulnerable plaque phenotype. *PloS One* **7**, e43229 (2012).
18. Zhu, Y. *et al.* Estimation of warfarin maintenance dose based on VKORC1 (-1639 G>A) and CYP2C9 genotypes. *Clin. Chem.* **53**, 1199–1205 (2007).
19. Yin, T. & Miyata, T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1 - rationale and perspectives. *Thromb. Res.* **120**, 1–10 (2007).
20. Wang, Y. *et al.* VKORC1 haplotypes are associated with arterial vascular diseases (stroke, coronary heart disease, and aortic dissection). *Circulation* **113**, 1615–1621 (2006).
21. Owen, R. P., Gong, L., Sagreiya, H., Klein, T. E. & Altman, R. B. VKORC1 pharmacogenomics summary. *Pharmacogenet. Genomics* **20**, 642–644 (2010).

22. Teichert, M. *et al.* Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) polymorphism and aortic calcification: the Rotterdam Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 771–776 (2008).
23. Tavridou, A. *et al.* Association of VKORC1 -1639 G>A polymorphism with carotid intima-media thickness in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **94**, 236–241 (2011).
24. Holden, R. M. *et al.* Sequence variation in vitamin K epoxide reductase gene is associated with survival and progressive coronary calcification in chronic kidney disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1591–1596 (2014).
25. Osman, N. A., El-Abd, N. & Nasrallah, M. VKORC1 gene (vitamin K epoxide reductase) polymorphisms are associated with cardiovascular disease in chronic kidney disease patients on hemodialysis. *Saudi J. Kidney Dis. Transplant. Off. Publ. Saudi Cent. Organ Transplant. Saudi Arab.* **27**, 908–915 (2016).
26. Turgut Cosan, D. *et al.* Susceptiveness of Vitamin K epoxide Reductase Complex Subunit 1 Gene Polymorphism in Essential Hypertension. *Genet. Test. Mol. Biomark.* **21**, 292–297 (2017).
27. Watzka, M. *et al.* Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: insights into improved patient diagnosis and treatment. *J. Thromb. Haemost. JTH* **9**, 109–118 (2011).
28. Kohn, M. H., Price, R. E. & Pelz, H.-J. A cardiovascular phenotype in warfarin-resistant *Vkorc1* mutant rats. *Artery Res.* **2**, 138–147 (2008).
29. Komai, M., Shirakawa, H. & Kimura, S. Newly developed model for vitamin K deficiency in germfree mice. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Vitam.-Ernährungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.* **58**, 55–59 (1988).
30. Mi, Y. *et al.* Establishing a rat model for the study of vitamin K deficiency. *Int. J. Exp. Pathol.* **97**, 187–193 (2016).
31. Grandemange, A. *et al.* Consequences of the Y139F *Vkorc1* mutation on resistance to AVKs: in-vivo investigation in a 7th generation of congenic Y139F strain of rats. *Pharmacogenet. Genomics* **19**, 742–750 (2009).
32. Hodroge, A. *et al.* VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *J. Thromb. Haemost. JTH* **10**, 2535–2543 (2012).
33. Hodroge, A., Longin-Sauvageon, C., Fourel, I., Benoit, E. & Lattard, V. Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch. Biochem. Biophys.* **515**, 14–20 (2011).
34. Matagrín, B. *et al.* New insights into the catalytic mechanism of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) - The catalytic properties of the major mutations of rVKORC1 explain the biological cost associated to mutations. *FEBS Open Bio* **3**, 144–150 (2013).
35. Hermodson, M. A., Suttie, J. W. & Link, K. P. Warfarin metabolism and vitamin K requirement in the warfarin-resistant rat. *Am. J. Physiol.* **217**, 1316–1319 (1969).
36. Greaves, J. H. & Ayres, P. Linkages between genes for coat colour and resistance to warfarin in *Rattus norvegicus*. *Nature* **224**, 284–285 (1969).
37. Tie, J.-K., Jin, D.-Y., Tie, K. & Stafford, D. W. Evaluation of warfarin resistance using transcription activator-like effector nucleases-mediated vitamin K epoxide reductase knockout HEK293 cells. *J. Thromb. Haemost. JTH* **11**, 1556–1564 (2013).
38. Czogalla, K. J. *et al.* Warfarin and vitamin K compete for binding to Phe55 in human VKOR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 77–85 (2017).
39. Cranenburg, E. C. M. *et al.* Vitamin K intake and status are low in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **82**, 605–610 (2012).
40. Booth, S. L. *et al.* Age and dietary form of vitamin K affect menaquinone-4 concentrations in male Fischer 344 rats. *J. Nutr.* **138**, 492–496 (2008).
41. Hammed, A., Matagrín, B., Spohn, G., Benoit, E. & Lattard, V. VKORC1L1, an enzyme rescuing the vitamin K 2,3-epoxide reductase activity in some extrahepatic tissues during anticoagulation therapy. *J. Biol. Chem.* **288**, 28733–28742 (2013).

42. Schurgers, L. J., Uitto, J. & Reutelingsperger, C. P. Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: a crucial switch to control ectopic mineralization. *Trends Mol. Med.* **19**, 217–226 (2013).
43. Metta, V. A., Mameesh, M. S. & Johnson, B. C. Vitamin K deficiency in rats induced by the feeding of irradiated beef. *J. Nutr.* **69**, 18–22 (1959).
44. Metta, V. C. & Johnson, B. C. Effect of feeding vitamin K-deficient diets to female rats. *J. Nutr.* **72**, 455–458 (1960).
45. Kaesler, N. *et al.* Impaired vitamin K recycling in uremia is rescued by vitamin K supplementation. *Kidney Int.* **86**, 286–293 (2014).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant ISI n°11301001W “NEORAMUS” from Bpi France.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.M., E.B., V.L. participated in research design; A.M., B.M., J.V.D., L.J.S. conducted experiments; A.M., E.B., L.J.S., V.L. performed data analysis; A.M., E.B., L.J.S., V.L. wrote or contributed to the writing of the manuscript:

DISCLOSURE

No competing financial interests have to be declared

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Influence of the diet on the coagulation function in YY and CC rats A/ Prothrombin time expressed in seconds and B/ factor II activity expressed as a percentage compared to the mean value obtained for YY^{+K3} group. In black squares, rats fed with standard diet; in grey circles, rats fed with diet –K3, during 12 weeks after the weaning. Results expressed as mean ± SD. n = 6 for groups YY and n = 11 and 10 for groups CC^{+K3} and CC^{-K3} respectively. * p<0.05 vs YY^{+K3} group. Statistical analysis was performed using Tukey’s multiple comparisons test. Statistic difference was reported when only a unique variable between groups is modified (either genotype or diet). P<0.01 was the accepted level of significance. a,b,c: statistical difference between 2 groups.

Figure 2: μCT analysis of various tissues of YY^{-K3} and CC^{-K3} rats. In A/ 3D-representations of calcification volume (in red) inside lung (in yellow), in B/ axial μ-CT views of calcifications present at the lung vessels of CC^{-K3} rats (calcifications are indicated by yellow arrows), in C/ 3D-representations of calcification volume (in red) inside aortic arch (in purple), in D/ 3D-representations of calcification volume (in red) inside testis (in grey), in E/ axial μ-CT views of calcifications present in testis of CC^{-K3} rats (calcifications are indicated by yellow arrows and epididymis is indicated by orange arrows).

Figure 3 : Tissue calcium content in testis, lung, heart, kidney and liver of 4 months old-YY or CC rats fed with standard diet (black square) or special diet –K3 (gray circle) since the weaning. Results are expressed as mean ± SD. n = 6 for groups YY and n = 11 and 10 for groups CC^{+K3} and CC^{-K3} respectively. Statistical analysis was performed using Tukey’s multiple comparisons test. Statistic difference was reported when only a unique variable between groups is modified (either genotype or diet). P<0.01 was the accepted level of significance. a,b,c: statistical difference between 2 groups

Figure 4 : Von-Kossa, hematoxylin-eosin (HE) and orcein staining of various tissues of CC rats feed with (CC^{+K3}) or without (CC^{-K3}) vitamin K₃ during 12 weeks. **A/** kidney, **B/** lung, **C/** testis, **D** and **E/** aortic cross. Black arrow points out calcifications.

Figure 5 : Score of ucMGP immunostaining and Von Kossa staining in heart (A), kidney (B) and testis (C) and correlation between ucMGP and Von Kossa staining (D) . In D, the line corresponds to the linear regression with its 95% confidence interval in dot line.

Figure 6 : Mechanism of the development of vascular calcification in CC rat fed with a normal diet not supplemented with vitamin K₃

Rats	Weight (g)	Creatininemia (μM)	Uremia (mM)	Phosphatemia (mM)	Calcemia (mM)
YY ^{+K3}	335 ± 19.3	22.0 ± 1.9	335 ± 19.3	1.90 ± 0.17	2.64 ± 0.19
CC ^{+K3}	368 ± 58.0	24.4 ± 4.25	368 ± 58.0	1.89 ± 0.22	2.62 ± 0.08
YY ^{-K3}	357 ± 21.6	24.3 ± 4.25	357 ± 21.6	1.72 ± 0.21	2.60 ± 0.12
CC ^{-K3}	320 ± 49.8	22.2 ± 1.48	320 ± 49.8	1.74 ± 0.25	2.59 ± 0.09

Table 1 : Weight and biochemical parameters of homozygous YY, CC and heterozygous YC rats aged of 16 weeks after a vitamin K₃ deficient diet (-K3) or standard diet (+ K3) feeding for 12 weeks. Results expressed as mean ± SD. n = 6 for groups for YY^{+k3} and YY^{-K3} groups and n = 11 and 10 for groups CC^{+K3} and CC^{-K3} respectively.

Tissue calcium ($\mu\text{g/g}$ of dry tissue)						
Rats	in liver	in heart	in kidney	in lung	in testis	in aorta
YY	244 \pm 31.7	331 \pm 42.8	510 \pm 133	786 \pm 228	341 \pm 66.8	429 \pm 111
YC	231 \pm 36.0	325 \pm 30.1	459 \pm 136	788 \pm 195	352 \pm 52.5	478 \pm 130
CC	218 \pm 46.4	308 \pm 31.4	537 \pm 136	857 \pm 267	343 \pm 38.1	478 \pm 205

Table 2 : Tissue calcium concentration of 1 year old-YY, YC and CC rats fed with standard diet. Results are expressed as mean \pm SD. n = 9 for YY and CC groups, n = 8 for YC group.

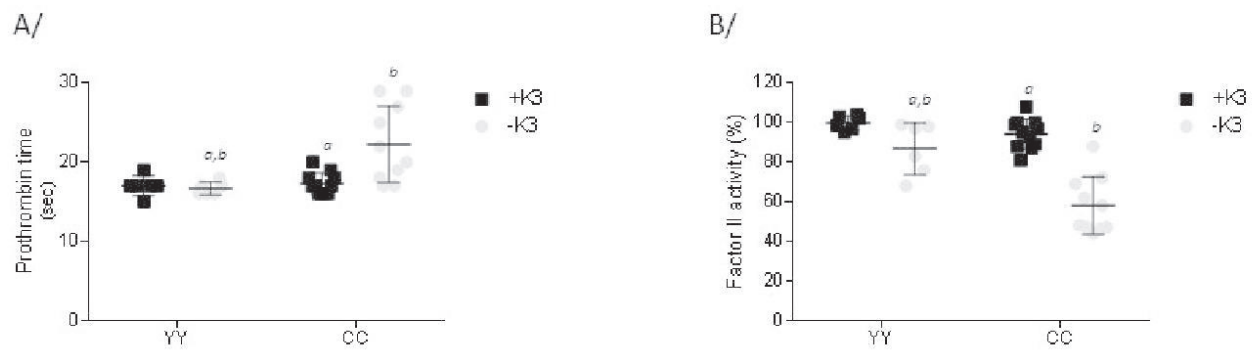
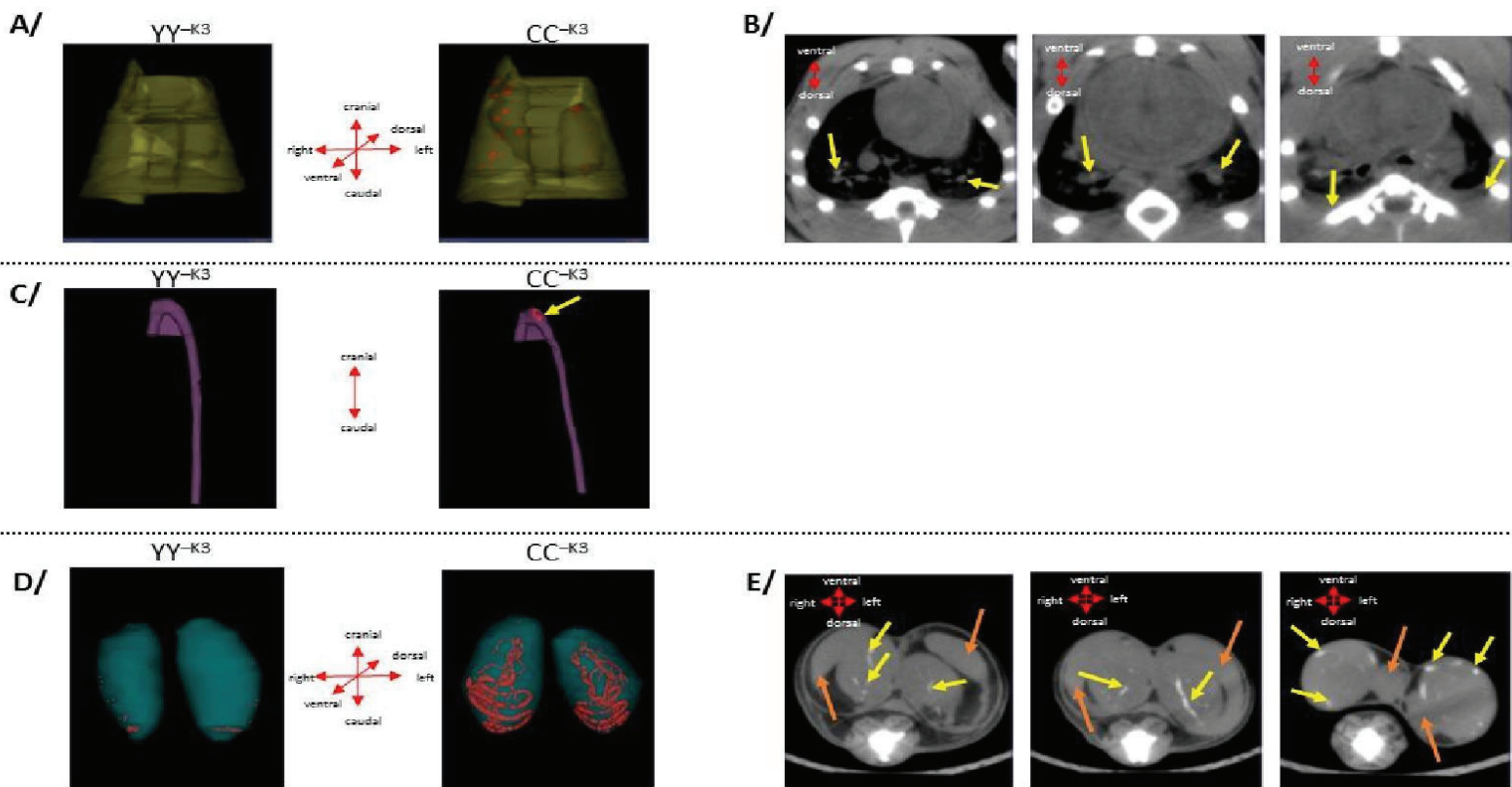


Figure 1 : Influence of the diet on the coagulation function in YY and CC rats A/ Prothrombin time expressed in seconds and B/ factor II activity expressed as a percentage compared to the mean value obtained for YY^{+K3} group. In black squares, rats fed with standard diet; in grey circles, rats fed with diet -K3, during 12 weeks after the weaning. Results expressed as mean \pm SD. n = 6 for groups YY and n = 11 and 10 for groups CC^{+K3} and CC^{-K3} respectively. * p<0.05 vs YY^{+K3} group. Statistical analysis was performed using Tukey's multiple comparisons test. Statistical difference was reported when only a unique variable between groups is modified (either genotype or diet). P<0.01 was the accepted level of significance. a,b,c: statistical difference between 2 groups.

Figure 2: μ CT analysis of various tissues of YY-K3 and CC-K3 rats. In A/ 3D-representations of calcification volume (in red) inside lung (in yellow), in B/ axial μ -CT views of calcifications present at the lung vessels of CC-K3 rats (calcifications are indicated by yellow arrows), in C/ 3D-representations of calcification volume (in red) inside aortic arch (in purple), in D/ 3D-representations of calcification volume (in red) inside testis (in grey), in E/ axial μ -CT views of calcifications present in testis of CC-K3 rats (calcifications are indicated by yellow arrows and epididymis is indicated by orange arrows).



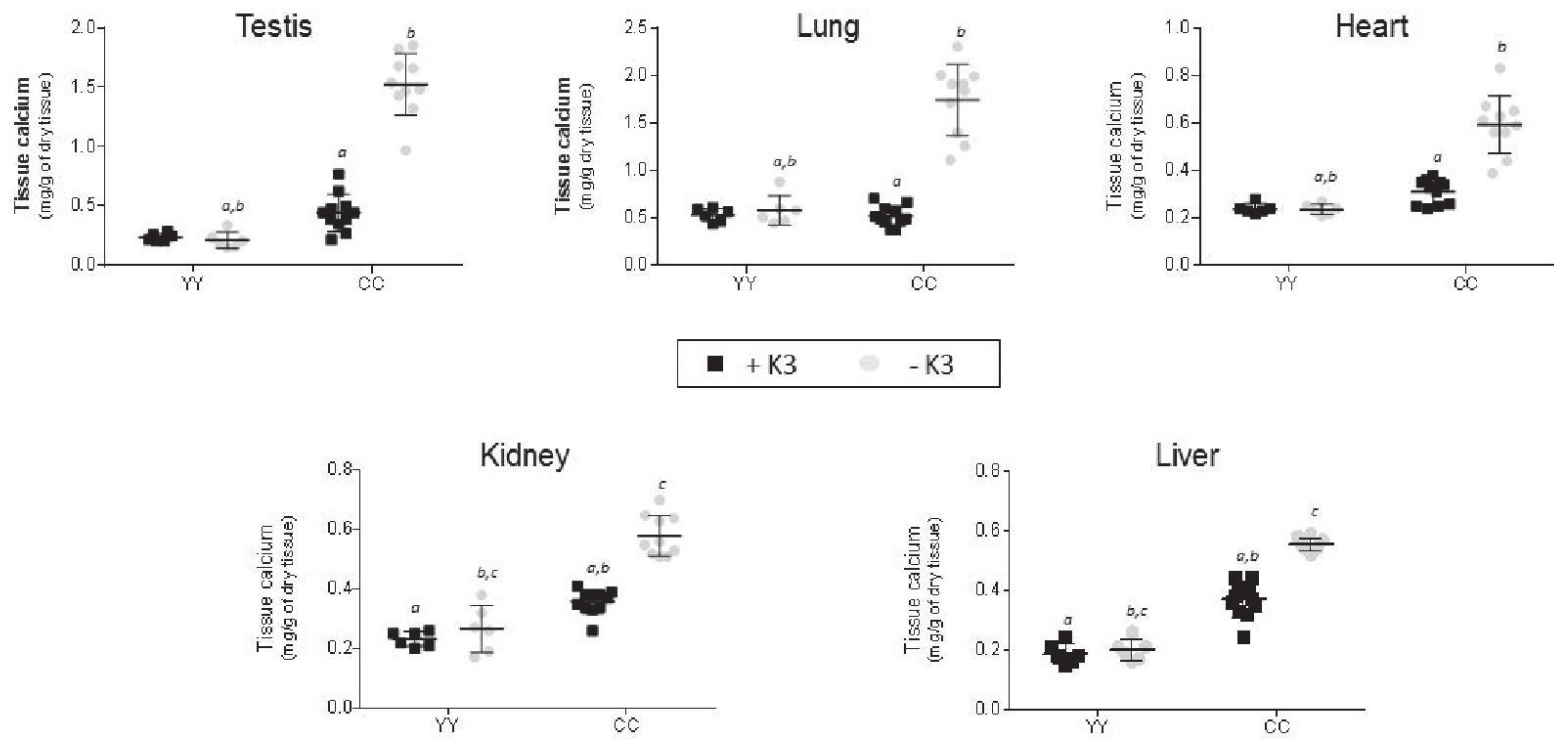


Figure 3 : Tissue calcium content in testis, lung, heart, kidney and liver of 4 months old-YY or CC rats fed with standard diet (black square) or special diet -K3 (gray circle) since the weaning. Results are expressed as mean \pm SD. n = 6 for groups YY and n = 11 and 10 for groups CC^{+K3} and CC^{-K3} respectively. Statistical analysis was performed using Tukey's multiple comparisons test. Statistical difference was reported when only a unique variable between groups is modified (either genotype or diet). $P < 0.01$ was the accepted level of significance. a,b,c: statistical difference between 2 groups

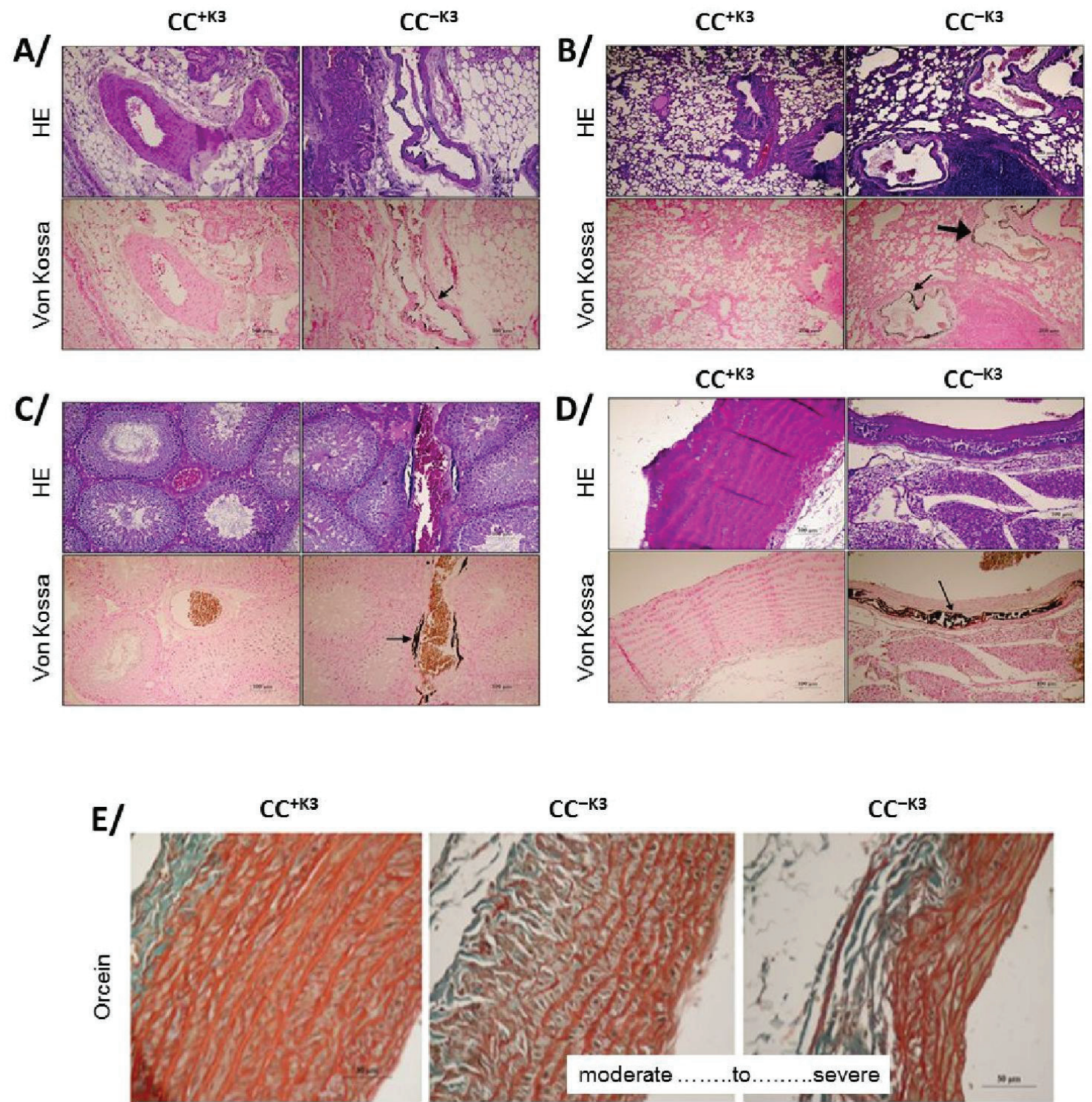


Figure 4 : Von-Kossa, hematoxylin-eosin (HE) and orcein staining of various tissues of CC rats feed with (CC+K³) or without (CC-K³) vitamin K₃ during 12 weeks. **A/** kidney, **B/** lung, **C/** testis, **D** and **E/** aortic cross. Black arrow points out calcifications.

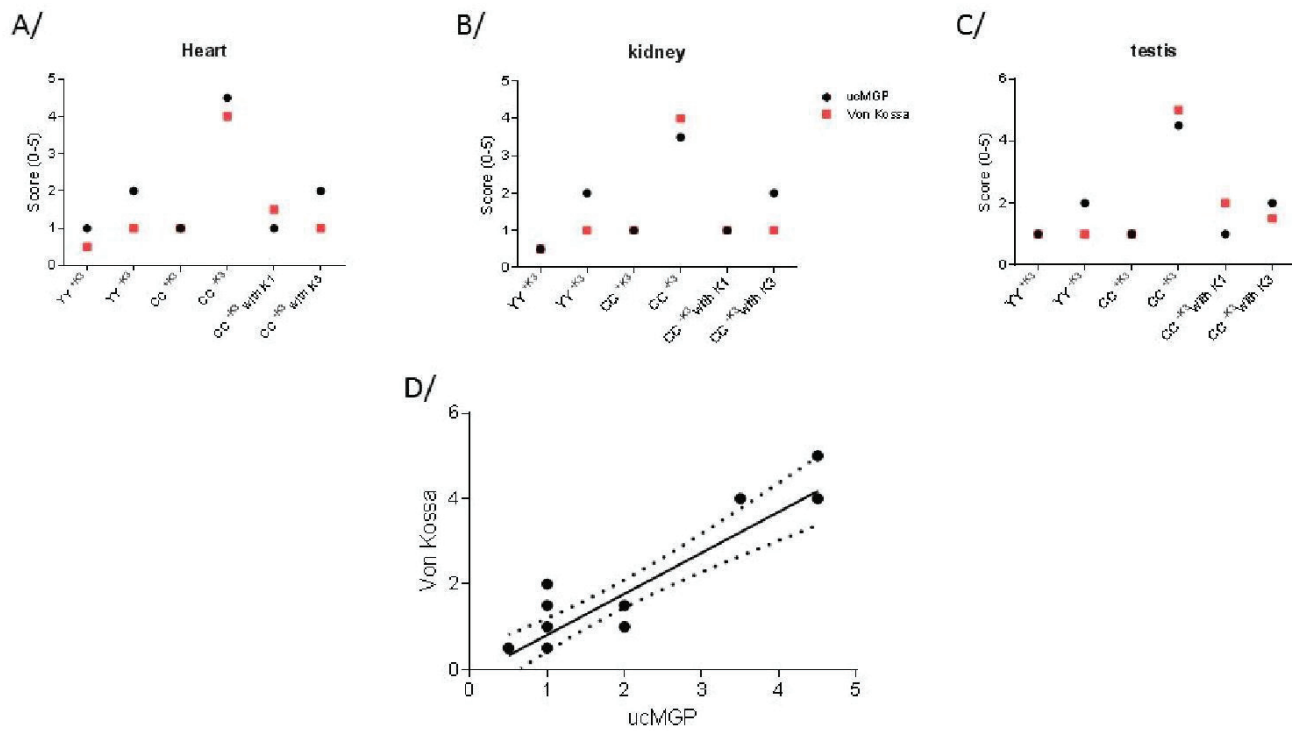


Figure 5 : Score of ucMGP immunostaining and Von Kossa staining in heart (A), kidney (B) and testis (C) and correlation between ucMGP and Von Kossa staining (D) . In D, the line corresponds to the linear regression with its 95% confidence interval in dot line.

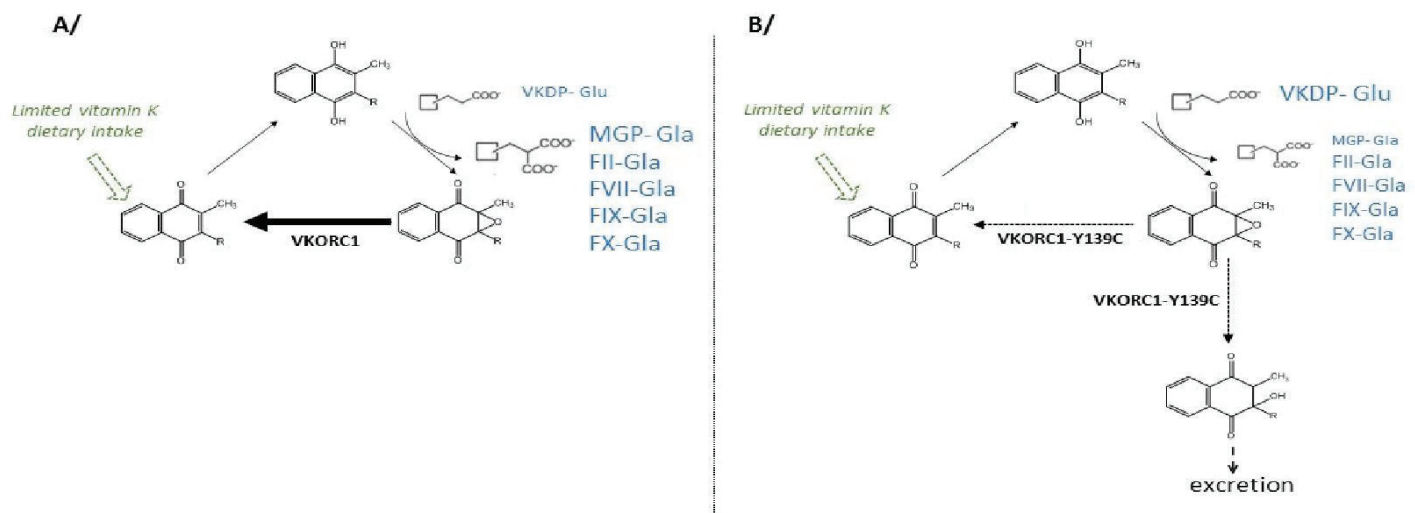


Figure 6 : Mechanism of the development of vascular calcification in CC rat fed with a normal diet not supplemented with vitamin K3

6.4 Autres résultats

6.4.1 Vitamine K tissulaire

Le testicule étant l'organe présentant les calcifications les plus importantes, il a servi comme organe de prédilection pour suivre l'évolution de la vitamine K tissulaire au cours du temps. Après 3 semaines (S3) et 12 semaines (S12) de régime sans ménadione chez les rats CC la concentration en MK4 est très fortement diminuée comparativement à leur état basal avant la mise en carence (S0) (figure 24). Elle ne représente plus que 4,77 % de l'état basal à S3 et est inférieure à 2% à S12. Des résultats préliminaires non présentés dans ce manuscrit avaient également montrés une diminution de la MK4 testiculaire chez les rats YY après 12 semaines de carence. Cette diminution restait cependant moins importante que chez les individus CC. Ces résultats montrent bien l'efficacité du régime carencé à diminuer les stocks en MK4 tissulaire.

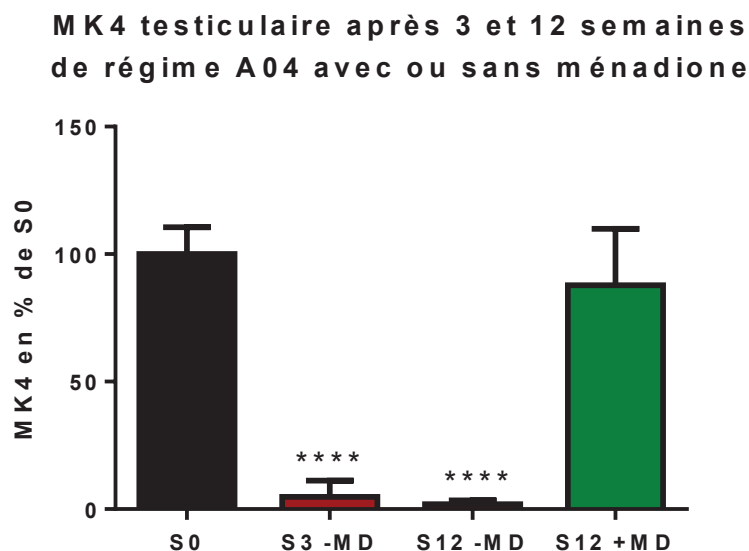


Figure 24 : Quantité de MK4 dans les testicules des rats homozygotes C139 à l'état basal (S0) et après 3 (S3) et 12 (S12) semaines de régime avec ou sans ménadione. Données exprimées en moyenne \pm SD du groupe YY S0. $n = 6$ à 15 par groupe. **** $p < 0,0001$ avec S0.

6.4.2 Expression de différents transcrits

Après 12 semaines de régime sans ménadione chez les rats CC aucune modification du taux d'expressions des différents transcrits impliqués dans le cycle de la vitamine K (VKORC1, VKORC1L1, GGCX), des PVKD (MGP et GAS6) et dans le métabolisme de la vitamine K (UBIAD1) n'est observé dans le foie (*figure 25A*) et les testicules (*figure 25B*) comparativement au groupe avec ménadione. Seule VKORC1 est significativement sous exprimée d'un facteur 2,44 dans le foie des rats sans ménadione. Cette sous expression reste cependant faible.

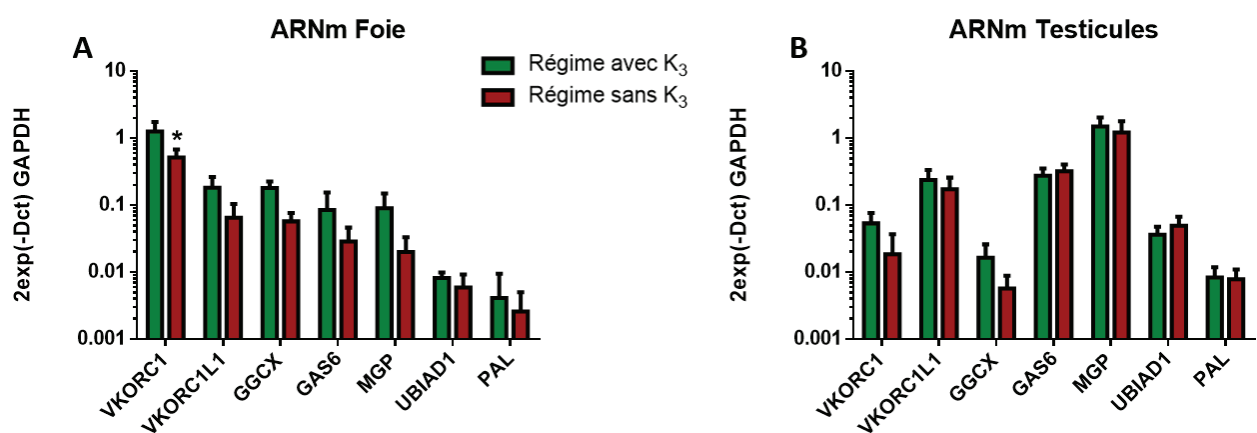


Figure 25 : Expression de différents ARNm dans le foie (A) et dans les testicules (B) de rats mâles homozygote C139 sous régime avec K₃ (vert) et sans K₃ (rouge) après 12 semaines. Données exprimées en moyenne \pm E.T. * $p < 0.005$. $n = 6$ par groupe.

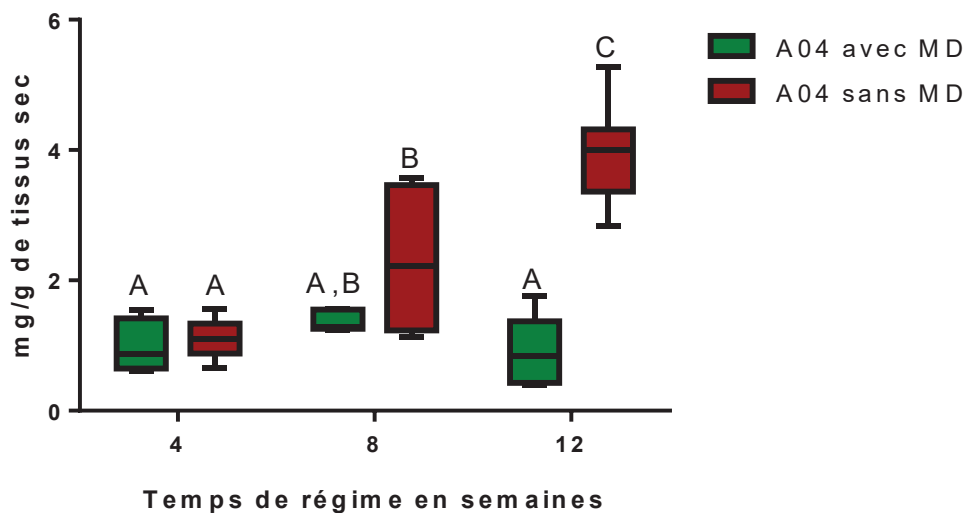
Un faible échantillonnage ($n = 6$), une forte variation inter-individus et une variation faible du taux d'expression peut expliquer cette absence de différence. De même une variation du nombre de transcrits n'est pas obligatoirement lié à une modification de l'expression des protéines associées et vis-versa. Ici le dosage de ces différentes protéines par western-blot n'a pas pu être réalisé. Il est donc difficile de trancher sur la seule base de ces résultats et des analyses complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre l'évolution de ces différents paramètres au cours d'une carence en vitamine K.

6.4.3 Calcifications : effet sexe et temps de régime

Comme présenté dans l'objectif N°1, la mise en régime standard ne permet pas de voir apparaître d'augmentation du calcium testiculaire après 4, 8 et 12 semaines chez les rats CC (*figure 26*). Après 4 semaines de régime sans ménadione, aucune augmentation du calcium testiculaire n'est observée (*figure 26*). Après 8 semaines une augmentation assez hétérogène, mais significative du calcium testiculaire est observée. Des individus sont fortement

augmentés avec 1,14 mg de calcium par gramme de tissus et d'autres semblables aux animaux non carencés avec 3,48 mg/g. Ces résultats montrent une certaine latence entre la mise en carence et l'apparition des calcifications et suggèrent qu'il faille un épuisement tissulaire en vitamine K avant de voir l'apparition de ces calcifications. Les organes pourraient disposer d'une réserve en vitamine K mobilisable. Après 12 semaines de subcarence, concentration en calcium testiculaire est encore augmentée indiquant un effet du temps de régime sur le développement de ces calcifications (*figure 26*).

Calcium testiculaire : Effet temps et régime



*Figure 26 : Calcium testiculaire chez des rats homozygotes C139 soumis à un régime standard A04 avec ménadione (vert) et sans ménadione (rouge) pendant 4, 8 et 12 semaines. * $p < 0,05$ avec le groupe avec ménadione à 4 semaines. N = 4 à 13 par groupe.*

Le suivi en μ CT des calcifications testiculaires chez 3 rats CC subcarencés en vitamine K confirment les observations précédentes. Aucune calcification n'est observée jusqu'à 32 jours de régime subcarencé puis les calcifications apparaissent à 49 jours avec un volume 1,72 ($\pm 1,49$) mm^3 (*figure 27*). Les calcifications augmentent ensuite de manières importantes en fonction du temps avec un volume de 5,57 ($\pm 2,24$), 12,3 ($\pm 8,60$) et 53,0 ($\pm 6,90$) mm^3 après 60, 90 et 150 jours respectivement (*figure 27*).

VOLUME des calcifications testiculaires

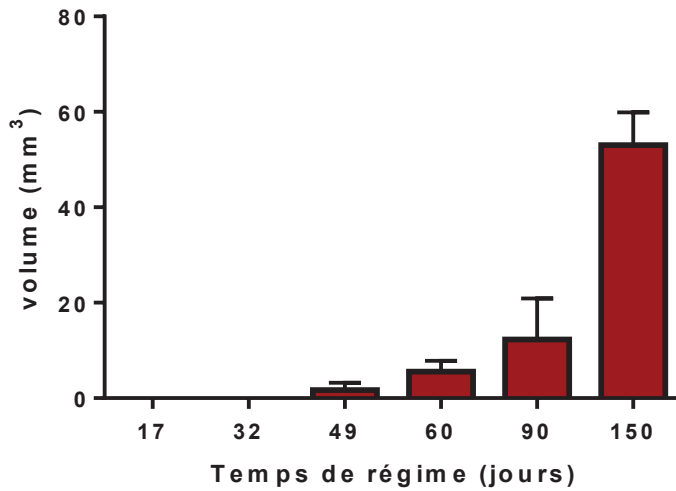


Figure 27 : Volume des calcifications testiculaires en mm³ chez des rats homozygotes C139 soumis à un régime A04 sans ménadione pendant 17, 32, 49, 60, 90 et 150 jours. N = 3 par groupe.

Les femelles sont moins sensibles que les mâles au traitement aux raticides et à la carence en vitamine K. Afin d'évaluer l'apparition de calcifications chez les femelles CC, 8 d'entre elles ont été soumises au même régime sans ménadione que les mâles pendant 12 semaines. Dans les reins (*figure 28A*) comme dans l'aorte (*figure 28B*) une tendance à l'augmentation du calcium est observée chez les femelles sans MD vs avec MD. On note également que l'augmentation du calcium dans l'aorte est plus importante chez les mâles que chez les femelles.

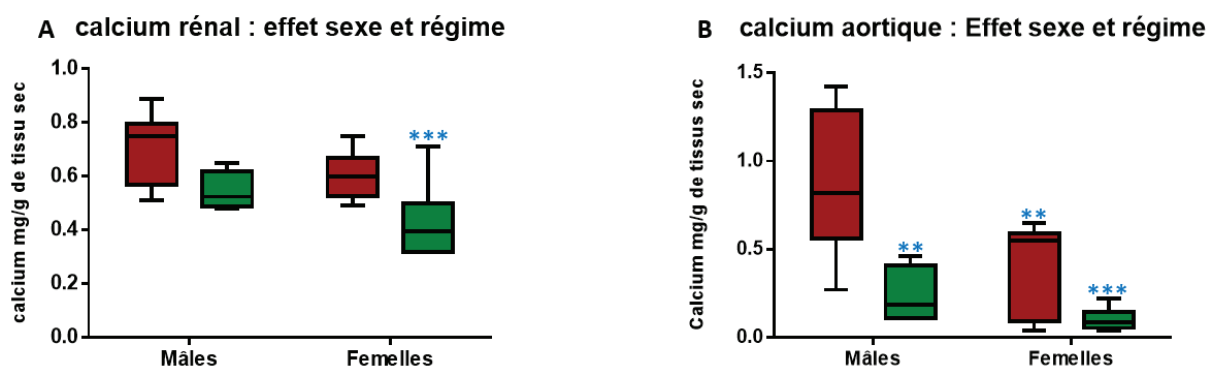


Figure 28 : Calcium en mg/g dans les reins (A) et l'aorte (B) chez des rats mâles et femelles CC soumis à un régime avec (vert) ou sans (rouge) ménadione. N = 4 à 9 par groupe. ** $p < 0,05$ avec mâles CC, *** $p < 0,01$ avec mâles CC.

L'augmentation du calcium aortique se traduit par l'apparition de calcifications visibles en colorations au rouge alizarine chez les rats mâles (*figure 29B et 29C*) et de manière moins importante chez les femelles (*figure 29E*). Ces calcifications semblent plus localisées au niveau des ramifications de l'aorte qu'au niveau du tronc principal.

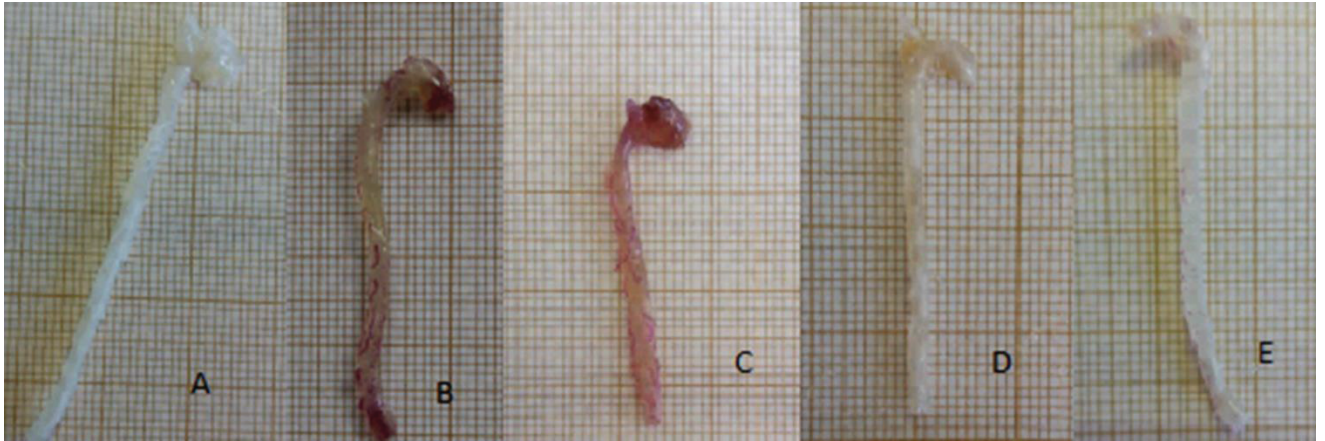


Figure 29 : Coloration au rouge alizarine d'aortes de rats mâles (A, B, C) et femelles (D, E) homozygotes C139 sous régime avec (A, D) ou sans (B, C, E) vitamine K3 pendant 12 semaines.

6.5 Conclusion :

Cet objectif a permis de montrer que des rats mâles CC nourris avec un régime standard sans ménadione sont les plus sensibles à l'apparition des calcifications vasculaires. Ces calcifications touchent la média artérielle et commencent à se développer après 8 semaines de subcarence en vitamine K pour augmenter en fonction de la durée du régime.

Ces calcifications médiales sont semblables aux calcifications retrouvées dans l'insuffisance rénale chronique, le diabète ou au cours du vieillissement chez l'Homme. Les rats mâles CC pourraient servir de modèle d'étude de ces calcifications vasculaires et plus généralement de modèle de subcarence en vitamine K.

Ce deuxième objectif a permis de valider le modèle de calcifications, mais d'autres études sont à prévoir pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes de régulation mis en jeu lors de la subcarence en vitamine K. Cette meilleure compréhension permettra également d'optimiser le modèle de calcification présenté. Cette optimisation passe par la comparaison entre elles des différentes lignées de rats mutés pour le gène VKORC1 et aussi la compréhension des modifications à très court terme à la suite d'une mise subcarence en vitamine K chez ces rats. C'est le troisième objectif de ce travail de thèse.

7 OBJECTIF 3 : COMPARAISON DU BESOIN EN VITAMINE K DANS DIFFERENTES LIGNEES

7.1 Objectif

Les 2 premiers objectifs ont permis de caractériser la lignée C139 et de valider un modèle de subcarence en vitamine K chez le rat mâle CC. L'unité USC1233 dispose également de 2 autres lignées (F139 et Q120) introgressées sur le même principe que la lignée C139. Les individus homozygotes mutés de ces lignées (FF et QQ) sont déjà reconnus pour leur résistance aux AVK et pour un avoir recyclage moins efficace de la vitamine K. Les rats mâles homozygotes mutés de ces lignées pourraient également servir de modèle d'étude de subcarence en vitamine K et de calcifications vasculaires.

L'objectif était ici d'évaluer dans ces 2 nouvelles lignées la réponse à la subcarence en vitamine K. Cette évaluation s'est faite sur le court terme en observant l'évolution des différents marqueurs de la carence représentés par le facteur II, le temps de Quick, la vitamine K tissulaire et l'ostéocalcine. La testostérone plasmatique qui semble être impacté par la carence en vitamine K chez le rat a également été évaluée.

7.2 Méthodes

Pour cette étude des rats mâles et femelles homozygotes CC mâles homozygotes SD, FF et QQ ont été utilisés. Les animaux ont été hébergés par 4 dans des cages de type T4. Le régime standard naturel A04 avec ménadione a été remplacé par le régime standard synthétique AIN93M (ref SAFE : U8978 v69) 7 jours avant le début de l'expérimentation. Au premier jour de l'expérimentation (J0) les rats ont tous reçu un régime synthétique AIN93M sans ménadione très pauvre en vitamine K (ref SAFE : U8978 v68). L'accès à l'eau courante et à la nourriture était ad libitum et les cages comprenaient un enrichissement simple (1 tube de PVC) avec un cycle jour/nuit 12/12 (jour de 8h à 20h). La température d'hébergement était de 22±2 °C. Dans la mesure où la mise en place d'un régime sans vitamine K peut empêcher la synthèse totale des facteurs de la coagulation, les animaux auraient pu montrer des signes d'hémorragies internes et ou externes, des difficultés respiratoires et/ou une prostration marquée. Si un de ces 3 points limites était retrouvé en cours de l'expérimentation, l'animal était euthanasié.

Aux échéances déterminées, du sang a été prélevé sous anesthésie gazeuse par ponction intracardiaque. Après la mise à mort des animaux le foie et les testicules ont été prélevés stockés à -20°C jusqu'à analyse.

7.3 Résultats résumés

La mutation du gène *Vkorc1* à l'état homozygote (FF, CC, QQ) chez le rat entraîne un statut basal en MK4 plus faible que chez les rats non mutés (SD) dans les testicules. Ces rats mutés présentent également une diminution plus importante de la MK4 testiculaire à la suite d'une subcarence en vitamine K.

La subcarence engendre une diminution du facteur II pour les rats mâles CC et QQ mais pas pour les rats SD et FF. Chez les rats QQ cette diminution est importante avec une diminution de 75% après 8 jours de subcarence. Cela se traduit par une augmentation du temps de Quick pour certains animaux de ce groupe.

Dans la lignée C139 la subcarence engendre moins d'effet sur les facteurs de la coagulation de la femelle que chez le mâle.

L'état basal en ostéocalcine plasmatique non-gamma-carboxylé est plus importante chez les rats CC que chez les rats YY et après 12 jours de carence seule les rats CC présentent une augmentation significative de cet ucOC.

La carence ne permet pas d'observer d'effet sur la testostérone plasmatique des rats mâles quelque soit le génotype.

7.4 Résultats détaillés

7.4.1 Expérimentation numéro 1

7.4.1.1 Coagulation

La mise en subcarence engendre une diminution des facteurs de la coagulation II, IX et X chez les rats mâles CC et une tendance chez les femelles CC (*figure 30*). La réponse à cette subcarence reste cependant assez hétérogène entre les individus d'un même groupe et peut se traduire par une augmentation significative du temps de quick pour certains d'entre eux. Cette hétérogénéité montre que les besoins en vitamine K ne sont pas couverts chez tous les individus pour le maintien d'une coagulation optimale et montre une régulation très fine des besoins en vitamine K. Comme observé dans l'objectif N°2 les rats non mutés YY ne sont pas

affectés quel que soit leur sexe. Le facteur IX des rats mâles YY est augmenté pour certains individus.

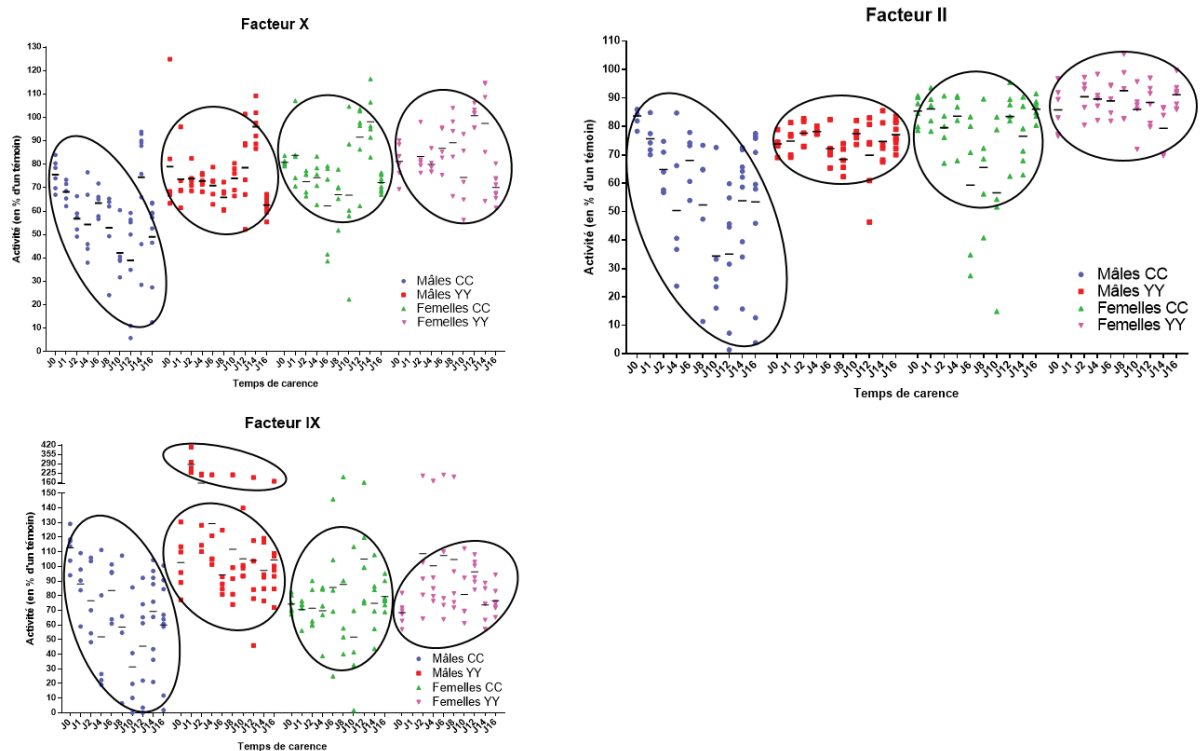


Figure 30 : Evolution des facteurs de la coagulation X, II et IX chez les mâles et les femelles YY et CC sous régime synthétique sans ménadione.

7.4.1.2 Vitamine K tissulaire

Pour mettre en relation la décroissance en facteur de la coagulation avec la décroissance en vitamine K tissulaire, la MK4 a été dosée dans les testicules des rats YY et CC (figure 31). Contrairement aux facteurs de la coagulation la carence en vitamine K engendre une diminution rapide de la MK4 testiculaire dans les 2 génotypes. Cette diminution est plus importante et plus rapide avec -50% en 4 à 6 jours, chez les rats CC contre -50% en 10 à 12 jours chez les rats YY. Le statut basal en vitamine K est également plus élevé à J0 pour les mâles YY. La carence a été maintenue pendant 16 jours. À cette échéance la concentration en MK4 n'est plus que de 6,73% de l'état basal chez les rats CC contre 42.26% pour les rats YY.

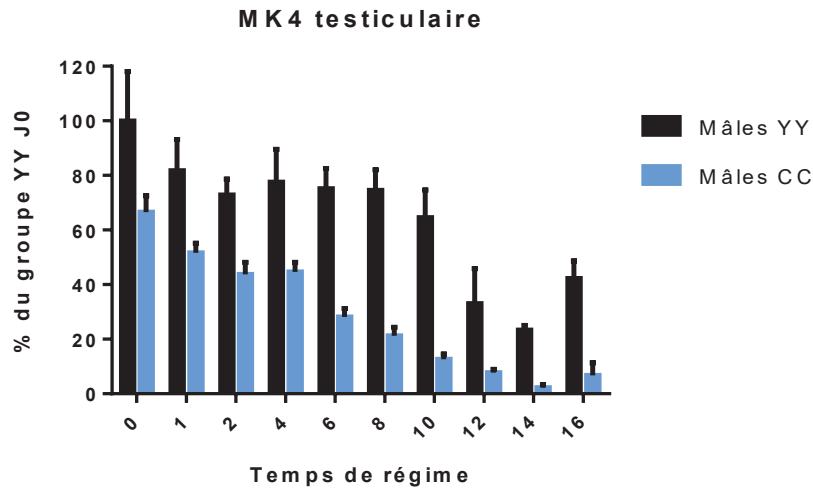


Figure 31 : MK4 testiculaires chez les rats YY (noir) et CC (bleu) sous régime synthétique sans ménadione pendant 16 jours. Valeurs exprimées en % du groupe YY J0. n=5 à 9 par groupe.

7.4.2 Expérimentation numéro 2

7.4.2.1 Vitamine K tissulaire

Afin de comparer la réponse à la subcarence des différentes lignées, une expérimentation semblable à la précédente a été réalisée sur les différents génotypes CC, FF, QQ et SD.

Les rats SD (disposant du génotype non muté YY) ont un statut en vitamine K testiculaire basal plus élevé que les 3 autres génotypes mutés (CC, FF, QQ) (figure 32). En plus d'un statut basal plus important, la carence entraîne une diminution en MK4 plus faible comparé aux autres génotypes. Les rats FF présentent un statut basal en MK4 plus faible que les 3 autres génotypes (YY, CC, QQ).

MK4 testiculaire sous régime synthétique sans ménadione

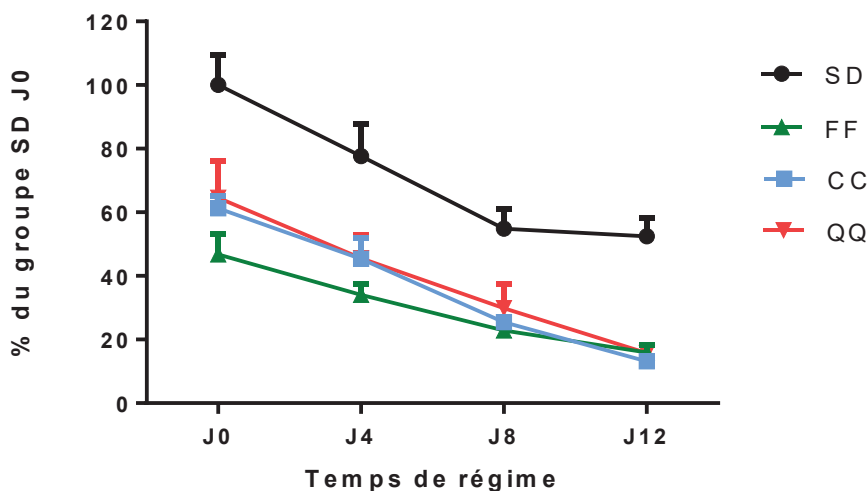


Figure 32 : MK4 testiculaire exprimé en % du groupe J0 SD chez des rats Sprague-dawley (noir), F139 (vert), C139 (bleu), Hamphsire (orange) sous régime synthétique sans ménadione pendant 12 jours. * $P < 0,05$. $n = 4$ à 6 par groupe.

7.4.2.2 Coagulation

Aucune différence d'activité du facteur II n'est observée à J0 entre les différents génotypes (figure 33). La carence n'a pas impacté la coagulation des rats SD et FF. Chez les rats QQ une diminution significative du facteur II de 55,5 ; 75,6 et 63,3 est observée après 4, 8 et 12 jours de régime carencé des rats QQ. Cela s'accompagne d'une augmentation très importante du temps de quick (supérieur à 100 secondes) pour certains individus (figure 34). Les rats CC montrent une diminution significative du facteur II après 8 jours de carence et une tendance après 4 et 12 jours. Comme pour les résultats précédents les individus CC présentent une hétérogénéité en termes de diminution du facteur II. Ces résultats montrent clairement une différence de sensibilité à la carence à la vitamine K pour le maintien de la coagulation avec une forte sensibilité pour les rats QQ.

Ces résultats mis en parallèles avec ceux de la diminution en MK4 testiculaire semblent indiquer une indépendance entre synthèses des PVKD liés à la coagulation et à la teneur en vitamine K tissulaire.

Facteur II sous régime synthétique sans ménadione

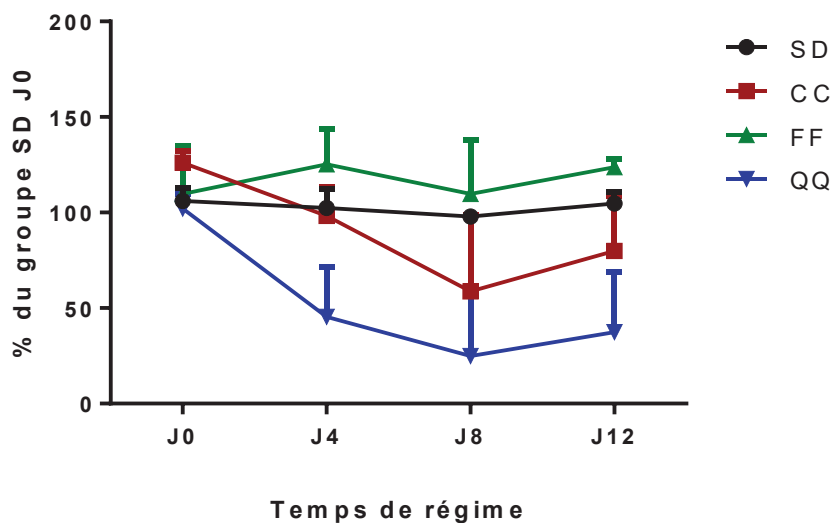


Figure 33 : Facteur II chez des rats mâles SD, CC, FF et QQ après 0, 4, 8 et 12 jours de régime synthétique sans ménadione.

Temps de quick

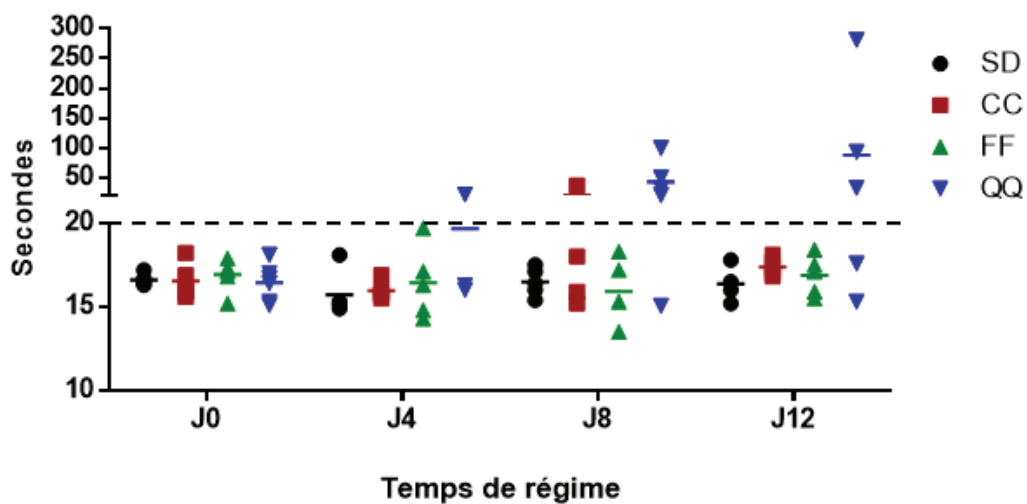


Figure 34 : Temps de quick chez les rats mâles SD, CC, FF et QQ après 0, 4, 8 et 12 jours de régime synthétique sans ménadione.

7.4.2.3 Ostéocalcine plasmatique

Avant la mise en carence, les rats CC ont 2,8 fois plus d'ucOC plasmatique que les rats SD (*figure 35*). Après 12 jours de subcarence les rats CC montrent une augmentation de 95,8% de l'ucOC comparativement à J0. La subcarence ne semble pas avoir d'effet sur les concentrations en ucOC plasmatique des rats SD montrant une fois encore que la subcarence en vitamine K chez les rats SD n'est pas efficace.

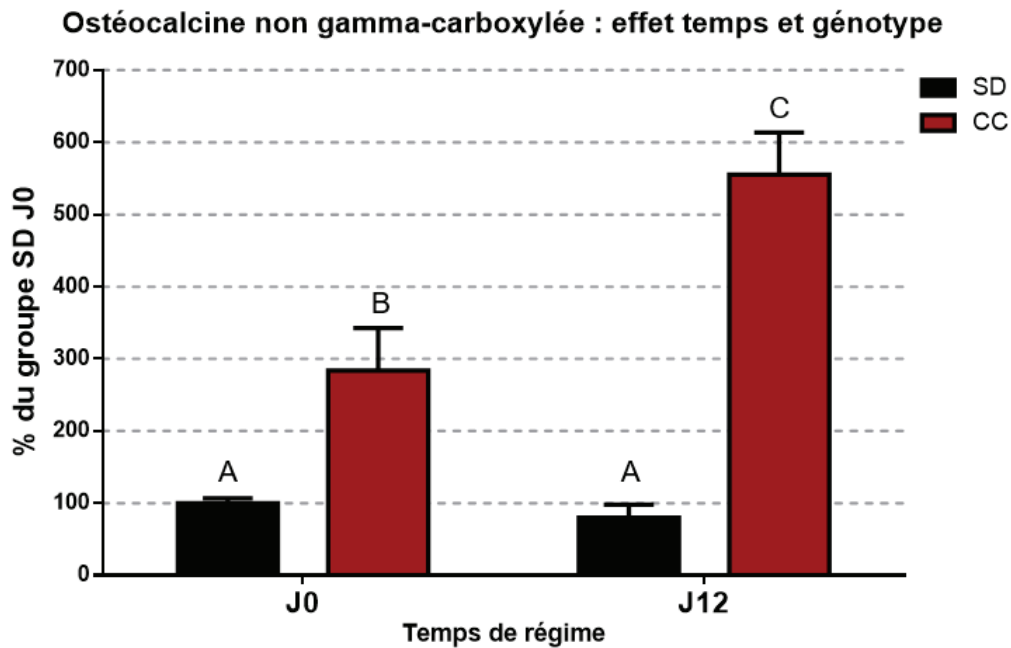


Figure 35 : Ostéocalcine plasmatique non-gamma-carboxylée chez des rats mâles SD et homozygotes C139 soumis à un régime synthétique sans ménadione pendant 12 jours. Valeurs exprimées en pourcentage du groupe SD J0. N = 4 à 6 par groupe.

7.4.2.4 Testostérone plasmatique

L'évaluation des concentrations en testostérone plasmatique ne permet pas de mettre en évidence une modification de ce paramètre au cours du temps et quelque soit le génotype observé (figure 36).

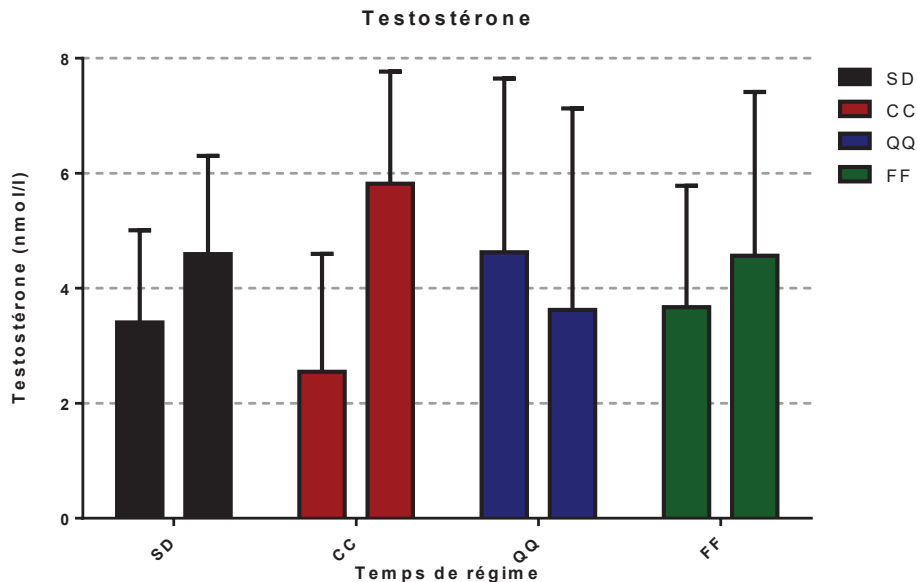


Figure 36 : Testostérone plasmatique.

Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de Shirakawa H en 2006 qui montre qu'une carence en vitamine K chez le rat induit une diminution du taux de testostérone plasmatique et qu'une supplémentation en MK4 l'augmente (Shirakawa et al., 2006). Dans cette étude les rats utilisés étaient exempt de flore intestinale « germ-free », mais dans une autre étude réalisée par la même équipe et aboutissant à la même conclusion les rats utilisés étaient des rats Wistar élevés en condition standard (Ito et al., 2011). Le rat Wistar est une souche régulièrement utilisée en expérimentation animale et ses besoins en vitamine K ne devraient pas s'éloigner des rats SD. Les rats CC se carencent de manière plus importante que les rats SD et devrait donc également être beaucoup plus sensible à un régime pauvre en vitamine K que le rat wistar. Si la carence en vitamine K explique à elle seule la diminution de la concentration en testostérone plasmatique et testiculaire, une importante diminution devrait être retrouvée dans nos différentes lignées.

Il est possible qu'un aspect méthodologique empêche d'observer les mêmes résultats que ceux obtenus par Shirakawa et Ito. Le dosage direct de la testostérone testiculaire permet de limiter les variations inter-individuelles au sein d'un même groupe est la différence entre animaux carencés et carencés est plus importante que lors du dosage de la testostérone plasmatique. Il serait intéressant dans le modèle de rats CC subcarencés d'évaluer cette

testostérone testiculaire en prenant un effectif plus important et en réalisant ce dosage pas la même technique Elisa qu'utilisée dans ces 2 études pour pouvoir réellement conclure sur ce point.

7.5 Conclusion

Ce 3^{ème} axe a permis de commencer à évaluer l'impact des différentes mutations entre les différentes lignées sur la réponse à la subcarence en vitamine K. Le rat SD (non muté pour *Vkorc1*) est le seul à ne pas être influencé par la carence quelque soit le paramètre observé à l'exception de la MK4 tissulaire.

Etonnamment le rat FF ne semble pas affecté au niveau de la coagulation mais beaucoup plus sur la MK4 tissulaire par rapport aux autres lignées. Pour cette raison il pourrait être un modèle plus intéressant que le rat CC pour l'exploration des calcifications vasculaires. Il serait donc intéressant d'évaluer la réponse de cette lignée face à la subcarence à long terme est sur l'apparition des calcifications vasculaires.

L'ensemble des résultats présentés dans cet axe va être complété par l'analyse du statut basal en calcium tissulaire sur les différentes lignées et dans différents organes et de l'expression des différents transcrits impliqués dans le cycle de la vitamine K.

Ces résultats mis en commun devraient faire l'objet d'un article à paraître dans le journal « Nutrients » en février 2018.

8 OBJECTIF 4 : VKORC1L1

8.1 Objectif

Le modèle de subcarence chez les rats mâles CC présenté dans l'objectif 2 provoque des calcifications artérielles importantes. De manière inattendue, ces calcifications sont remarquablement visibles dans les testicules des rats. Cette localisation n'avait jamais été suggérée dans la littérature et en particulier dans les études cliniques développées chez des patients traités à la warfarine ou dans les modèles utilisant ce même anticoagulant.

Des travaux relatifs au métabolisme de la vitamine K et en particulier les travaux sur VKORC1L1 ont montré que cette enzyme est particulièrement abondante dans certains tissus extrahépatiques comme les testicules (Hammed et al., 2013). Cette enzyme s'avère également être plus résistante à la warfarine que son homologue VKORC1.

Dans les tissus extrahépatiques présentant une forte activité VKORC1L1, il est probable que la résistance de cette enzyme face aux AVK permette de garder un recyclage efficace de la vitamine K. La quantité de vitamine K nécessaire à la prévention du développement de calcifications vasculaires est alors maintenue. Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi dans la littérature il n'a pas encore été reporté, ni chez l'Homme ni chez les rats, de cas de calcifications vasculaires dans les tissus exprimant fortement l'enzyme VKORC1L1 lors d'un traitement au long cours aux AVK. Tout au contraire, le modèle présenté dans le second objectif est basé sur la subcarence en vitamine K et non l'inhibition de VKORC1. La déplétion vitamine K, observée dans ce modèle, le rend vraisemblablement moins dépendant du recyclage de la vitamine K époxyde par VKORC1L1.

Afin de mieux comprendre le rôle de l'enzyme VKORC1L1, une première étude a été effectuée pour comparer les facteurs de résistance relatifs entre VKORC1 et VKORC1L1 face aux principaux AVK commercialisés. Une approche en biologie moléculaire a également été réalisée pour essayer d'identifier les acides aminés responsables de cette plus forte résistance. Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans la revue « Biochemistry & Molecular Journal » en 2016. Il est présenté de la pages 134 à 144 de ce manuscrit.

La disponibilité d'un inhibiteur de VKORC1L1 très efficace *in vivo* sur VKORC1L1 extra-hépatique et en particulier sur l'enzyme testiculaire, sans être inhibiteur de VKORC1, permettrait d'objectiver le rôle de VKORC1L1 dans les calcifications vasculaires et tout particulièrement dans les calcifications testiculaires. Un tel inhibiteur permettrait de réaliser une sorte de « KO chimique ».

L'USC 1233 possède une chimiothèque confidentielle de plus d'une centaine de molécules ayant une activité anticoagulante (antivitamine K). Dans cet objectif, un travail de « screening »

in vitro de cette chimiothèque a été réalisé pour identifier un ou plusieurs inhibiteurs spécifiques.

8.2 Résultats

8.2.1 Propriétés de VKORC1L1

Identification of Key Functional Residues in the Active Site of Vitamin K Epoxide Reductase-like Protein (VKORC1L1)

Benjamin Matagrín,
Abdessalem Hammed,
Arnaud Michaux,
Ahmed Hodroge,
Etienne Benoit and
Virginie Lattard

USC 1233 INRA-Vetagro Sup, Veterinary School of Lyon, France

Corresponding author:
Dr. Virginie Lattard

✉ virginie.lattard@vetagro-sup.fr

USC 1233 INRA-Vetagro Sup, Veterinary School of Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France.

Tel: 0478872727

Citation: Matagrín B, Hammed A, Michaux A, et al. Identification of Key Functional Residues in the Active Site of Vitamin K Epoxide Reductase-like Protein (VKORC1L1). *Biochem Mol Biol J.* 2016; 2:3.

Abstract

Background/Purpose: Vitamin K is involved in the gamma-carboxylation of the vitamin K dependent proteins. Due to the limited intake of vitamin K, its regeneration is necessary and involves the vitamin K 2,3-epoxide reductase (VKOR) activity. This activity is catalyzed by VKORC1 and/or VKORC1L1 proteins. Warfarin is able to inhibit both enzymes, but VKORC1L1 appears to be 30-fold more resistant to warfarin than VKORC1.

Methods: To predict functional peptide regions or amino acid residues important for VKOR activity or resistance to vitamin K antagonists (VKA) of human VKORC1L1, we conducted a multiple alignment of VKORC1L1 and VKORC1 sequences. The role of conserved amino acid residues between VKORC1 and VKORC1L1, but also the role of conserved amino-acid residues in VKORC1L1 but not in VKORC1 were challenged by systematic engineering of point mutations combined with *in vitro* functional assays.

Findings: Interestingly, engineering mutants at position 130 allowed us to obtain a VKORC1L1 as susceptible to VKA as wild type VKORC1. Our results also suggested the involvement of Cys-43(+7), Cys-51(+7), Cys-132(+7) and Cys-135(+7), in the transfer of the redox power to vitamin K epoxide.

Conclusion: Altogether, this study provides novel insight into VKORC1L1 active site functional domains. Glu-130 is a key residue governing the natural resistance of VKORC1L1 to VKAs.

Keywords: Vitamin K; Protein; VKOR

Received: May 28, 2016; **Accepted:** September 17, 2016; **Published:** September 22, 2016

Introduction

The vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity has been described since the early 70s' [1]. This VKOR activity allows the reduction of vitamin K epoxide in order to regenerate vitamin K quinone. This activity is a key step of the vitamin cycle and is the target of vitamin K antagonist (VKA). The *VKORC1* gene has only been identified in 2004 [2,3]. This gene encodes for a 163 amino acid protein with, probably, four transmembrane domains and a luminal loop. This protein contains also a C₁₃₂XXC₁₃₅ redox motif, as previously hypothesized by Silverman [4]. This motif is located in the fourth transmembrane domain.

VKA actively inhibit VKORC1 in the liver and thus limit the gamma-carboxylation of hepatic VKD proteins resulting in an intense anticoagulant effect. VKA are extensively used worldwide for prevention and treatment of thromboembolic disorders. Many missense mutations have been detected in *VKORC1* gene in humans and rats and are sometimes associated to a VKA resistance phenotype [5-7].

Until 2011, VKORC1 was considered as the only protein able to catalyze the VKOR activity. Nevertheless, Westhofen et al. [8] described that a paralogous enzyme of *VKORC1*, the *VKORC1L1*, could also reduce vitamin K₂O to vitamin KH₂ when expressed in HEK293T cells. Resulting from a gene duplication of an early

common VKOR ancestor, there is 50% of homology between this protein and VKORC1 [9]. The VKORC1L1 gene encodes for a 176 amino acids protein with almost the same structure than VKORC1. However, this VKOR activity was described with a low enzymatic efficiency and then they propose that VKORC1L1 is responsible for driving the vitamin K mediated intracellular antioxidation pathway critical to cell survival by generating vitamin KH_2 [8].

In another hand, Hammed et al. [10] emphasized two main differences between VKORC1L1 and VKORC1. VKORC1L1-catalyzed VKOR activity is 30-fold more resistant to warfarin than that catalyzed by VKORC1. The tissue distributions of the corresponding mRNA are quite different. Liver expression of *Vkorc1L1* mRNA is very low in comparison to *Vkorc1*. On the contrary, in other tissues such as lung or testis, the expression of these two genes is similar. These data argue for the fact that VKORC1L1 does not interfere with the coagulation process which is supported by the liver. On the contrary, these data argue for the fact that VKORC1L1, being resistant to VKA, could protect extra-hepatic tissues against the effects of VKAs. These results provide an interesting explanation for the low or even the absence of clinical consequences on the gamma carboxylation of vitamin K-dependent proteins (VKDP) produced by extra-hepatic tissues such as matrix Gla protein (MGP) [11], osteocalcin (OC) [12] or Gas 6 [13]. Indeed, the absence of gamma carboxylation of MGP should create ectopic mineralization [14] and the absence of gamma carboxylation of osteocalcin should have consequences on energetic metabolism [15,16].

Unlike VKORC1 proteins, which have been subjected to extensive investigation, our understanding of the mechanism of action of VKORC1L1 is limited. As the contrast between the susceptibility to VKAs of VKORC1 and VKORC1L1 appears to be an important determinant for the biological function of the VKORC1L1 protein, the objective of this paper is to analyze the structural basis of the natural resistance of VKORC1L1 to VKAs in the absence of 3D-structures of VKORC1L1 proteins. To highlight important residues for VKORC1L1 function, sequences alignments were first performed between VKORC1 proteins and VKORC1L1 proteins. Finally, using site directed mutagenesis, we analyzed the functional implications of these highlighted amino acid residues. Our results suggest the central function of Glu-130₍₊₇₎ amino acid residue in the natural resistance to VKAs of VKORC1L1 compared with VKORC1.

Methods

Plasmid constructions

Human VKORC1 and VKORC1L1 coding sequences fused with a c-myc tag *via* a flexible (GGG)₃ in its 3'-extremity was optimized for heterologous expression in yeast and synthesized by GenScript (Piscataway, NJ, USA). Synthesized nucleotide sequences included EcoRI and XbaI restriction sites at their 5'- and 3'-extremities, respectively. These nucleotide sequences were subcloned into pPICZ-B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and sequenced on both strands. Construction of amino acid substituted mutants of VKORC1 or VKORC1L1 was carried out using pPICZ-VKORC1 or pPICZ-VKORC1L1 as template, respectively, with the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Mutants were

systematically checked by sequencing, and the various mutants were individually expressed in *P. pastoris*.

Heterologous expression in *Pichia pastoris*

Heterologous expressions of VKORC1 and VKORC1L1 proteins were performed in *Pichia pastoris* as described previously [5,17]. pPICZ-VKORC1 or VKORC1L1 vectors were individually transformed into the *P. pastoris* SMD1168 yeast strain using the *P. pastoris* Easy Comp Transformation kit (Invitrogen). Transformants were selected on YPD plates (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) dextrose) containing 100 µg/ml Zeocin (Invitrogen). The cells were grown in BMGY medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% (w/v) yeast nitrogen base, and 1% (v/v) glycerol). Expression was induced by methanol (1%, v/v) for 48 h at 30°C in a rotary shaker (200 rpm). Yeast cells were collected by centrifugation (3000 g-10 min) and immediately frozen at -20°C.

Subcellular fractionation of recombinant yeast cells

Yeast microsomes were prepared from thawed yeast cells by differential centrifugation. Briefly, yeast cells were resuspended in 50 mM Phosphate Buffer (pH 7.4) containing 1.15% (w/v) of KCl. Yeast cells were broken with Zircon beads using Dispermat® LC30 (VMA-GETZMANN, germany) (15 min-3500 rpm) a continuously at 4°C and further submitted to differential centrifugation. The 100,000 g pellet corresponding to the membrane fraction was resuspended by Potter homogenization in HEPES glycerol buffer (50 mM Hepes, 20% glycerol, pH 7.4). Protein concentrations were evaluated by the method of Bradford using bovin serum albumin as a standard. Microsomes were frozen at -80°C and used for kinetic analysis.

Immunoblot analysis

Expression level quantification of VKORC1 and VKORC1L1 proteins in microsomal fractions were determined by western blotting as described previously [6]. Microsomal proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto Immobilon-P membranes and probed with anti-c-myc antibodies (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The resulting immunocomplexes were visualized using alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse immunoglobulins as secondary antibodies and a BCIP/NBT solution. Quantification of the stained bands was performed by densitometry using the Scion Image software. The relative intensity (RI) of the signal was correlated to the quantity of microsomal proteins. The relation was linear from 0 to 50 µg for microsomal proteins.

To evaluate the expression level of VKORC1 and VKORC1L1 proteins, the expression of wild type human VKORC1 was designated as the basal expression. For the quantification of wild type or mutant VKORC1 or VKORC1L1, the same unique pool of yeast microsomes containing human VKORC1 was used. Therefore, its expression factor was by definition 1. The expression level of VKORC1 or VKORC1L1 proteins was evaluated by comparison to the expression of human VKORC1. For this purpose, various amounts (from 0 to 20 µg) of microsomal proteins containing human VKORC1 and various amounts (depending on the

expression level) of microsomal proteins containing VKORC1 or VKORC1L1 proteins were analyzed on the same western blot. Two linear relations ($RI = a \times \text{quantity of microsomes loaded}$) were obtained, the first one for microsomes containing human VKORC1 (characterized by a specific slope $a^{hVKORC1}$), the second one for microsomes containing VKORC1 or VKORC1L1 proteins (characterized by a slope a^{target}). Ratio $a^{\text{target}}/a^{hVKORC1}$ allowed us to determine the expression factor characterizing the expression level of VKORC1 or VKORC1L1 proteins in the microsomal fraction compared with the expression level of the human VKORC1.

Vitamin K epoxide reductase activity (VKOR) assays and kinetics

Microsomal vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity was assayed as described previously [5,17]. Briefly, standard reactions were performed in 200 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 150 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 0.25 to 2 g.L⁻¹ of total proteins containing membrane VKORC1. The reaction was started by the addition of vitamin K₁>0 solution in 1% Triton X-100 and incubated at 37°C for 30 min. In these conditions, the reaction was linear according to the time of incubation and the quantity of incubated proteins. After incubation at 37°C for 30 min, the reaction was stopped by adding of 4 mL of iced 1:1 isopropanol/hexane solution. After centrifugation at 5000 g for 10 min, the hexane layer was removed and dried under nitrogen. The dry residue was immediately dissolved in 0.2 mL of isopropanol and reaction product was analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry.

The LC-APCI/MS/MS used was a 1100 Series LC/MSD ion Trap VL with an Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) interface and a LCMS Chemstation software from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Chromatographic separation was performed using a SunFire reverse phase C8 column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm, Waters, Milford, MA, USA) with a mobile phase of methanol, 0.1% acetic acid (95:5) in isocratic conditions. The column temperature was 45°C. The flow rate in the LC column was 1 ml/min. The injection volume was 20 μl. The temperature of the autosampler tray was set to 5°C and the samples were protected from the daylight. Detection was by MS/MS with APCI source in positive mode. Nebulizer pressure was set to 60psi, dry gas temperature to 350°C, dry gas flow to 5 L/min, and vaporizer temperature to 400°C. Capillary voltage was set to 4000V, corona needle to 4000 nA, and CID to 1V. Collision gas in the trap was helium with a pressure of 0.6*10⁻⁵ mbar. Identification criteria for vitamin K₁ are the retention time ($t_r = 4.1$ min) and the product ion $451 \geq 187$ ($m/z(+)=187$). Identification criteria for vitamin K₁>0 are the retention time ($t_r = 3.4$ min) and the product ion $467 \geq 307$ ($m/z(+)=307$). Linearity and accuracy were tested from 25 to 2000 ng/ml ($n=20$). The response was linear throughout the concentration range tested with a coefficient of correlation (r^2) above 0.99. Accuracy was between 80 and 120% of the theoretical concentrations.

K_m , V_{max} and K_i values were obtained from at least three separate experiments performed on two different batches of protein. The estimation of K_m and V_{max} values was achieved by the incubation of at least 9 different concentrations of vit K>O (from 0.003 to

0.2 mM) to the standard reaction. Incubations were performed in duplicate. Data were fitted by nonlinear regression to the Michaelis-Menten model using the R-fit program. In order to evaluate the inhibiting effect of warfarin on VKOR activity, K_i were determined after addition of various concentrations of anticoagulant to the standard reaction in the presence of increasing amounts of vit K>O (from 0.003 to 0.2 mM) using anticoagulant concentrations from about 0.05 to 20× K_i . Data were fitted by non-linear regression to the non-competitive inhibition model $v = (V_{max}/(1+(I/K_i)))*(S/(K_m+S))$ using the R-fit program.

Results

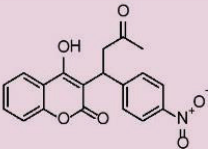
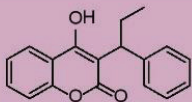
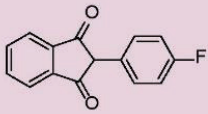
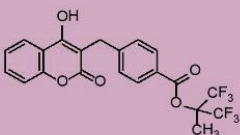
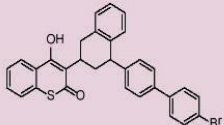
Comparative inhibition of VKOR activity catalysed by VKORC1 or VKORC1L1

The susceptibility of wild type VKORC1L1 to various VKAs used either in human medicine or as rodenticide was evaluated comparatively to that of wild type VKORC1. Results are presented in **Table 1**. While VKORC1 was inhibited by all the VKAs used in this study with K_i lower than 0.5 μM (except for warfarin and phenprocoumon), VKORC1L1 was particularly resistant to some VKAs with K_i systematically higher than 0.5 μM. More exactly, VKORC1L1 was roughly 30-fold more resistant to warfarin, a 4-hydroxycoumarin-derivative and the most VKA used worldwide, than VKORC1 (52 μM vs 1.7 μM). In the same way, fludione, an indanedione derivative largely used in France was completely ineffective to inhibit VKORC1L1 with a K_i 80-fold higher than that obtained for VKORC1 (21.3 μM vs 0.25 μM). Acenocoumarol and phenprocoumon were more effective to inhibit VKORC1L1 than warfarin and fludione, but K_i obtained (i.e., 2.7 and 5.4 μM, respectively) were still largely higher than those obtained for VKORC1 (i.e., 0.3 and 0.7 μM, respectively). VKORC1L1 was also resistant to tecarfarin, a new VKA developed to avoid the CYP-450-dependent metabolism pathway [16]. K_i towards tecarfarin obtained with VKORC1L1 was 30-fold higher than that obtained with VKORC1 (2.4 vs 0.08 μM). The most potent VKAs, such as difenacoum, brodifacoum and difethialone, which possess very low K_i towards VKORC1, were also assayed in this study. These VKAs are used as rodenticide due to their good efficiency even on resistant strains of rats. Even towards these very effective VKAs, VKORC1L1 was approximately 7-fold more resistant than VKORC1, (Difenacoum 0.7 μM vs 0.1 μM, Brodifacoum 0.6 μM vs 0.15 μM, Difethialone 0.9 μM vs 0.2 μM).

VKORC1 and VKORC1L1 alignment

To gain insight into potential functional domains or amino acid residues of VKORC1L1 involved in VKOR activity and/or resistance to VKAs in the absence of 3D-structure of VKORC1L1 proteins, we performed a multiple alignment of 20 selected VKORC1L1 sequences plus 26 VKORC1 sequences, taken as an outgroup (**Figures 1 and 2**). VKORC1L1 proteins contain 176 amino acid residues, while VKORC1 proteins contain 163 amino acid residues. The sizes of the N-terminal and the C-terminal domains are longer in the VKORC1L1 group compared with the 26 VKORC1 proteins. The sequence comparison highlighted i) a very strong identity between VKORC1L1 sequences (between 85 % and 100 % according to the species considered) and ii) a limited degree of

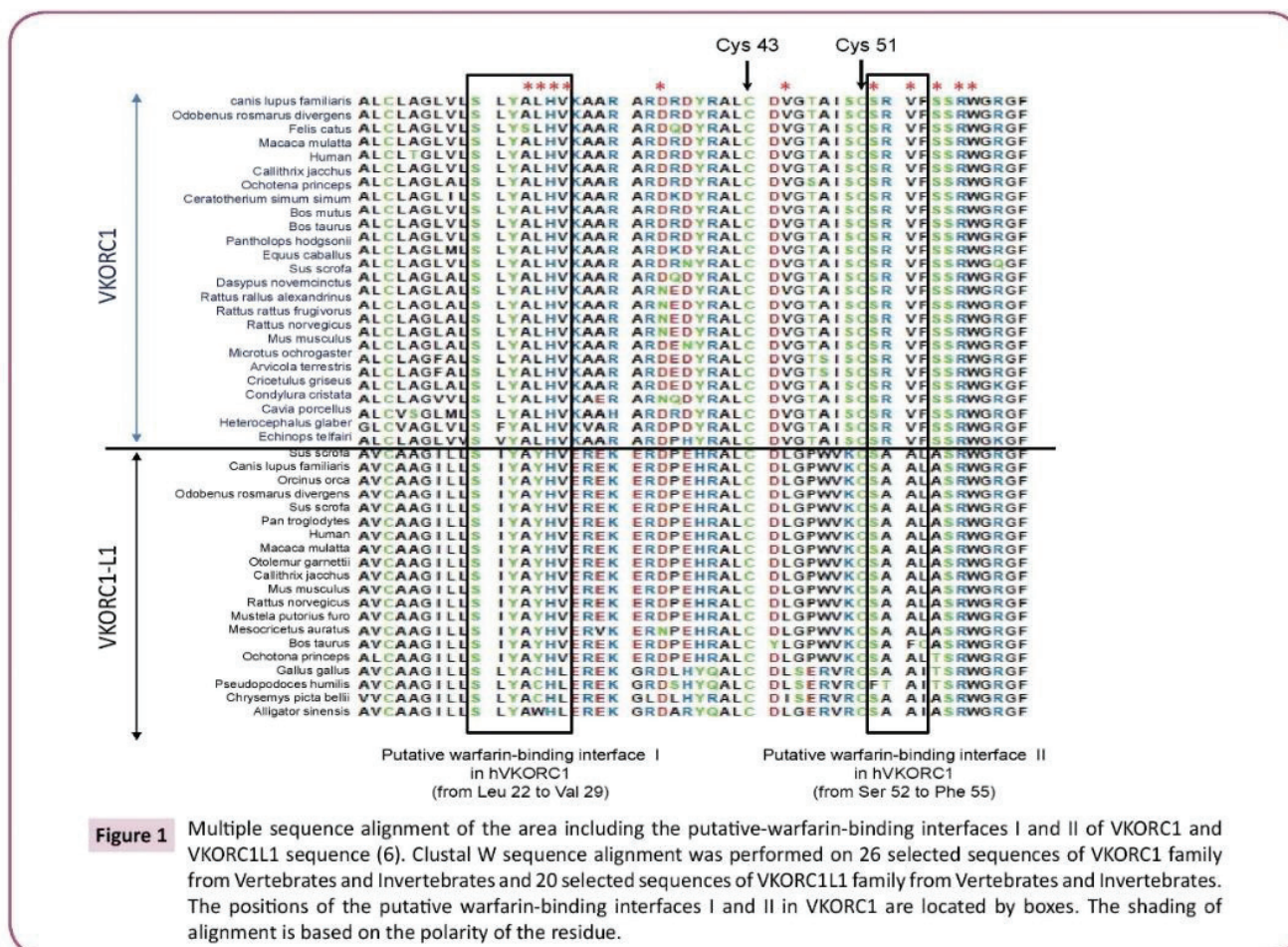
Table 1 K_i values of human VKORC1 and human VKORC1L1 proteins towards various VKA. Inhibition parameters were assessed using anticoagulant concentrations from about 0.05 to $20 \times K_i$.

Molecule	Chemical structure	K_i hVKORC1 (μ M)	K_i hVKORC1L1 (μ M)	K_i hVKORC1L1 / K_i hVKORC1
Warfarin		1.65 ± 0.79	52.0 ± 3.0	32
Acenocoumarol		0.33 ± 0.18	2.69 ± 0.8	8
Phenprocoumon		0.72 ± 0.31	5.36 ± 1.6	7
Fluindione		0.25 ± 0.14	21.3 ± 1.3	85
Tecarfarine		0.08 ± 0.01	2.40 ± 0.40	30
Difenacoum		0.12 ± 0.03	0.71 ± 0.09	6
Brodifacoum		0.15 ± 0.02	0.57 ± 0.08	4
Difethialone		0.18 ± 0.03	0.87 ± 0.16	5

identity between VKORC1L1 sequences and VKORC1 sequences (~50% of identity) with two remarkable conserved peptide domains with an identity higher than 75%. More precisely, 47 amino acid positions are identical, both in the VKORC1 outgroup and in the VKORC1L1 family. Among these conserved positions, 9

are located in the first conserved motif and 17 are located in the second conserved motif; the others are distributed all along the alignment.

The first conserved domain from amino acid 64 to amino acid 72



of VKORC1L1 sequences (i.e., the "SRWGRGFGL" motif) is strictly conserved between VKORC1L1 and VKORC1 sequences (Figure 1). Nevertheless, none of these residues were described to be of importance in VKORC1. Close to the first domain are found the Cys-43 and Cys-51 strictly conserved in VKORC1 proteins and proposed as important residues in VKORC1 proteins. These Cys are also strictly conserved in VKORC1L1 proteins in position 50 and 58, respectively (Figure 1).

The second conserved domain between VKORC1 and VKORC1L1 proteins contain amino acid 123 to amino acid 146 in VKORC1L1 (i.e., corresponding to the residues 116 to 139 in VKORC1). This domain is highly conserved with 75% of identity between VKORC1L1 sequences and VKORC1 sequences (Figure 2). This second domain contains the "CXXC" motif proposed as catalytic site in the VKORC1 proteins. This "CXXC" motif is also present in VKORC1L1 proteins from amino acid position 139 to 142 (Figure 2). Close to this domain are found the main amino acid positions of VKORC1 leading to severe resistance to VKA (i.e., amino acid position 120, 128 and 139). Leu-120, Leu-128 and Tyr-139 strictly conserved between VKORC1 proteins are also strictly conserved between VKORC1L1 in position 127, 135 and 146, respectively (Figure 2). On the other hand, because the hypothetical catalytic mechanism proposed by Silverman [3] for VKORC1 implies the involvement of nucleophilic amino acid residues close to the

catalytic site, the conservation of nucleophilic amino acid residues between VKORC1 and VKORC1L1 proteins inside the second conserved domain was analyzed. In VKORC1, three nucleophilic residues close to the catalytic site are found in position 129 (i.e., Tyr), 130 (i.e., Asp) and 139 (i.e., Tyr). In VKORC1L1 proteins, the first nucleophilic amino acid is not conserved and is replaced by a basic amino acid found in position 136 (i.e., Lys) but totally conserved between VKORC1L1 proteins. The two other nucleophilic residues close to the catalytic site conserved between VKORC1 are also conserved in VKORC1L1 proteins and correspond to Tyr-146 and Glu-137.

The presence of 7 additional amino acids in the first 20 amino acids of VKORC1L1 leads to a gap of the numbering of amino acid residues between VKORC1 and VKORC1L1 sequences. To facilitate the understanding of the results, we decide to number amino acids of VKORC1L1 by the number of the corresponding amino acid in VKORC1 and to add to this number (+7) in index.

Analysis of the importance of the "CXXC" motif in the function of VKORC1L1

To address the functional contribution of the "CXXC" motif in the vitamin K epoxide reductase activity catalyzed by VKORC1L1, we conducted a systematic site-directed mutagenesis approach.

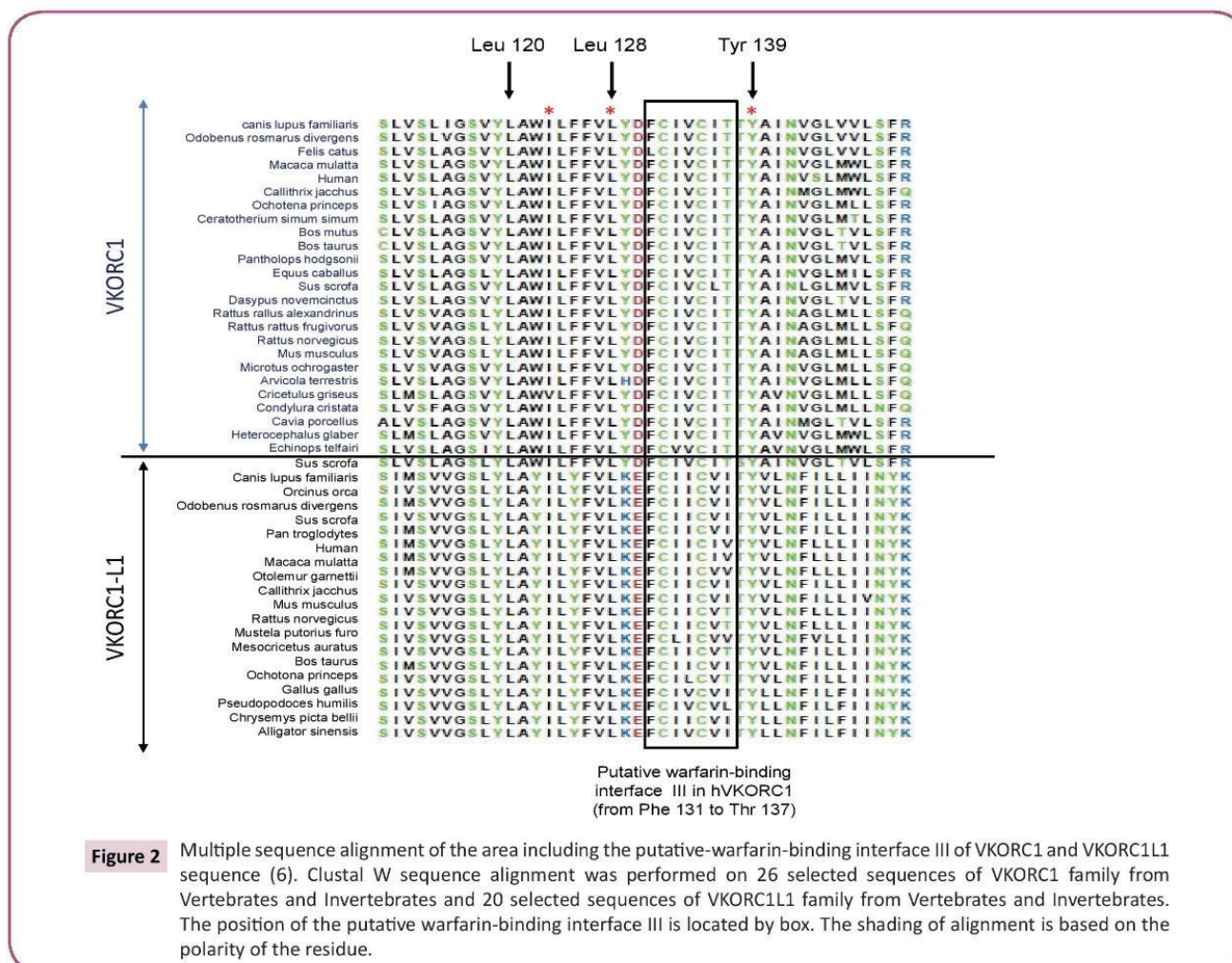


Figure 2 Multiple sequence alignment of the area including the putative-warfarin-binding interface III of VKORC1 and VKORC1L1 sequence (6). Clustal W sequence alignment was performed on 26 selected sequences of VKORC1 family from Vertebrates and Invertebrates and 20 selected sequences of VKORC1L1 family from Vertebrates and Invertebrates. The position of the putative warfarin-binding interface III is located by box. The shading of alignment is based on the polarity of the residue.

Individual cysteines were subjected to non-conservative substitutions to generate 2 mutants VKORC1L1-C132₍₊₇₎A and VKORC1L1-C135₍₊₇₎A. Wild-type and mutant VKORC1L1 enzymes were expressed at a similar level in *Pichia pastoris* (data not shown) and tested for *in vitro* vitamin K epoxide reductase activity using K₁>0 as substrate. Activity of the recombinant enzymes determined in the presence of 200 μM of K₁>0 was normalized to the amount of expressed protein, and values are presented in **Figure 3**. The recombinant wild type VKORC1L1 exhibited high activity up to 20 pmol·min⁻¹·mg protein, although it was undetectable in mock-transformed yeasts. On the other hand, replacement of each cysteine of the “CXXC” motif completely abolished the *in vitro* enzyme activity (i.e. less than 2% of the recombinant VKORC1L1 activity), emphasizing the prevalent function of the “CXXC” motif for the vitamin K epoxide reductase activity of VKORC1L1.

Analysis of the importance of Cys-43₍₊₇₎ and Cys-51₍₊₇₎ in the function of VKORC1L1

To further investigate the importance of conserved Cys-43₍₊₇₎ and Cys-51₍₊₇₎ in the VKOR activity catalyzed by VKORC1L1, we analyzed the catalytic effects of non-conservative mutation of

these residues into Ala. Upon expression, VKORC1L1-C43₍₊₇₎A and VKORC1L1-C51₍₊₇₎A mutants were expressed at similar or higher levels than that of the wild-type enzyme (data not shown). Interestingly, replacement of Cys-43₍₊₇₎ or Cys-51₍₊₇₎ of VKORC1L1 by Ala abolished the *in vitro* VKOR activity (i.e. less than 2% of the recombinant VKORC1L1 activity) in the presence of saturating concentration of K₁>0, suggesting the major role of both Cys in the function of VKORC1L1.

Analysis of the importance of the nucleophilic amino acid residues surrounding the “CXXC” motif of VKORC1L1

In the next series of experiments, we explored the specific function of Lys-129₍₊₇₎, Glu-130₍₊₇₎ and Tyr-139₍₊₇₎ amino acid residues surrounding the “CXXC” motif. To address the importance of these invariant amino acids in VKOR activity, a series of mutants exhibiting non-conservative and/or conservative substitutions at each position were engineered to generate 6 mutants VKORC1L1-K129₍₊₇₎Y, VKORC1L1-E130₍₊₇₎A, -E130₍₊₇₎H, -E130₍₊₇₎D, VKORC1L1-Y139₍₊₇₎A and -Y139₍₊₇₎F. The recombinant proteins were produced in yeast *P. pastoris*. Immunoblot analysis indicated

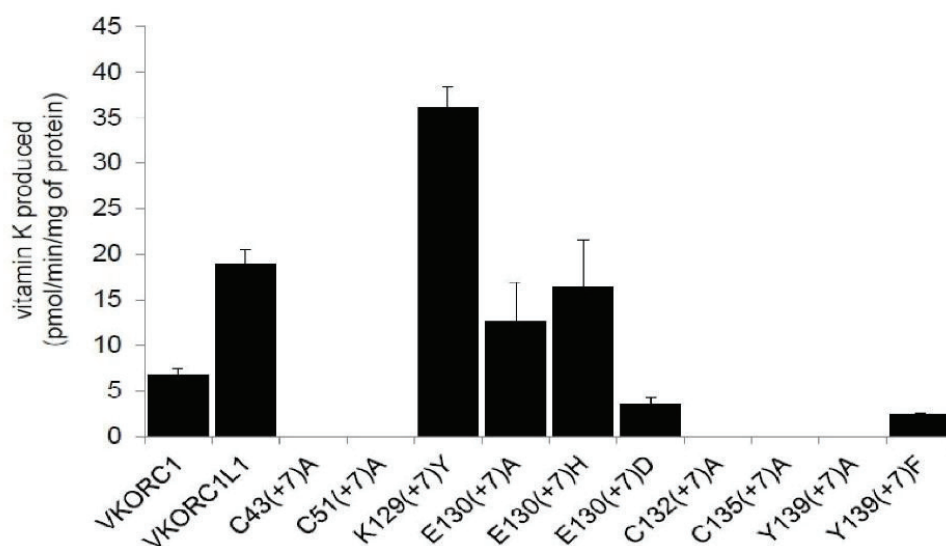


Figure 3 Specific activity of WT-VKORC1L1 and its mutants. Enzyme activity was evaluated in the presence of 200 μM of KOX and 0.25 to 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of microsomal proteins containing membrane WT or mutated VKORC1L1 after normalization of the recombinant proteins expression level by immunoquantification. Each data point represents the mean \pm SD of three individual determinations and is representative experiment performed on two different batches of protein. * $p < 0.02$ compared to VKORC1.

that these mutants were all produced and their expression factor was comprised between 0.3 to 2 compared with the expression of recombinant wild type VKORC1 protein used as a standard (data not shown).

To evaluate the consequences of the mutations on the enzyme function, we analyzed the activity of mutated VKORC1L1 proteins (**Figure 3**). VKORC1L1-K129₍₊₇₎Y exhibited up to 200% vitamin K epoxide reductase activity in the presence of 200 μM of $\text{K}_1 > 0$ compared with wild-type VKORC1L1 enzyme; VKORC1L1-E130₍₊₇₎A and VKORC1L1-E130₍₊₇₎H exhibited up to 67 and 86% vitamin K epoxide reductase activity. The non-conservative mutation of Tyr-139₍₊₇₎ in Ala abolished the VKOR activity suggesting the important role of this residue in VKOR activity (**Figure 3**). On the contrary, the replacement of Tyr-139₍₊₇₎ by Phe, another aromatic amino acid residue led to a mutant that exhibited up to 14% vitamin K epoxide reductase activity, indicating that Phe and Tyr residues are to some extent interchangeable at this position. Kinetic parameters and susceptibility to VKA were thus determined for active mutated VKORC1L1 proteins and are presented in **Tables 2 and 3**, respectively.

Discussion

Even if VKORC1L1 was initially proposed to be responsible for driving the vitamin K mediated intracellular antioxidation pathway [8], its crucial role in the gammacarboxylation of extrahepatic VKDP is becoming increasingly obvious. In the absence of VKA treatment, involvement of VKORC1L1 in the gamma-carboxylation of extrahepatic VKDP is at least as important as VKORC1. On the other hand, during long-term anticoagulation therapy with warfarin, VKORC1L1, which is 30-fold more resistant

to warfarin than VKORC1 [10], is certainly the only enzyme supporting the VKOR activity in extrahepatic tissues and thus, the gammacarboxylation of extrahepatic VKDPs. Warfarin was the first molecule developed as VKA. Since then, numerous vitamin K-antagonists molecules were developed. While these molecules are all much more potent to inhibit VKORC1 than warfarin, their ability to inhibit VKORC1L1 is still unknown. This question is of major interest if we consider that some of these molecules are also used in human medicine during long-term anticoagulation and that their use could naturally inhibit the coagulation process, but also other extrahepatic VKDP-dependent physiological processes not inhibited by the use of warfarin.

To address this question, recombinant VKORC1L1 was expressed in *P. pastoris* and VKOR activity was characterized by a DTT-driven VKOR assay, as previously described [5,10]. This experimental approach is a direct approach based on the measurement of the VKORC1 reaction product, the vitamin K. The results obtained by this method, and particularly the resistance factors to VKAs obtained by this method, were successfully confronted to results obtained by *ex vivo* and *in vivo* assays [17,18-20]. This experimental approach was recently challenged by other indirect approaches designed as cell-based VKOR assays [6,7,21] based on the measurement of the gamma-carboxylation of overexpressed clotting factors by the constitutive GGX in the presence of vitamin K hydroquinone produced by the overexpressed VKORC1. Since the results obtained by the different developed cell-based VKOR assays are conflicting between them, we chose intentionally to use the DTT-driven VKOR approach, as previously used [10] to characterize the VKOR activity of VKORC1L1.

Seven molecules, known to inhibit VKORC1, were tested in this study as inhibitor of VKORC1L1. These molecules are either

Table 2 Apparent kinetic parameters towards K^{>0} of human VKORC1, VKORC1L1 and mutated VKORC1L1 proteins. V_{max} values determined at saturating concentration of K^{>0} were evaluated after normalization of the recombinant proteins expression level by immunoquantification. Each data point represents the mean ± SD of three individual determinations. * p<0.02 compared to WT.

Protein	K _m (μM)	V _{max} (pmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	V _{max} /K _m (nL.min ⁻¹ .mg ⁻¹)
hVKORC1	21.5 ± 4.2	7.1 ± 0.5	330
hVKORC1L1	24.1 ± 3.0	20.7 ± 0.9	859
K129 ₍₊₇₎ Y	22.2 ± 11.8	39.2 ± 5.1	1766
E130 ₍₊₇₎ A	29.8 ± 8.9	13.1 ± 4.4	440
E130 ₍₊₇₎ H	31.1 ± 8.3	19.0 ± 5.1	611
E130 ₍₊₇₎ D	19.1 ± 5.7	3.8 ± 0.7	199
Y139 ₍₊₇₎ A	–	–	–
Y139 ₍₊₇₎ F	25.1 ± 1.2	2.7 ± 0.1	108

Table 3 K_i values of human VKORC1, VKORC1L1 and mutated VKORC1L1 proteins towards warfarin. Inhibition parameters were assessed using anticoagulant concentrations from about 0.05 to 20×K_i.

Protein	K _i (μM)
hVKORC1	1.65 ± 0.79
hVKORC1L1	52.0 ± 0.79
K129 ₍₊₇₎ Y	12.3 ± 1.9
E130 ₍₊₇₎ A	3.2 ± 1.1
E130 ₍₊₇₎ H	3.6 ± 1.1
E130 ₍₊₇₎ D	3.2 ± 0.8
Y139 ₍₊₇₎ A	–
Y139 ₍₊₇₎ F	>300

4-hydroxycoumarin or 4-hydroxy-1-thiocoumarin or indanedione derivatives. Whatever the structure of the molecule is, K_i obtained for VKORC1L1 systematically increases as compared to human VKORC1, as it was already observed with warfarin [10]. Hydrophobicity and length of lateral chain of the molecules seems to favor the interaction of anticoagulant with VKORC1L1 (Table 1) and (Figure 4), as previously described for VKORC1 [17,19]. Contrary to human VKORC1, 4-hydroxycoumarin structures seems to interact with VKORC1L1 more efficiently than indanedione structures. Among these molecules, four are used (i.e., acenocoumarol, phenprocoumon, fludindione) [22] or developed to be used (i.e., tecarfarin) [18,23] in human medicine and three are used as rodenticides (i.e., difenacoum, brodifacoum, difethialone) [24]. All these molecules are able to inhibit human VKORC1L1 in a non-competitive manner, as observed for human VKORC1 [5]. Nevertheless, all the molecules used in human medicine (i.e., acenocoumarol, phenprocoumon, fludindione, tecarfarin) are very bad inhibitors of VKORC1L1 (with K_i higher than 2 μM) while they are able to efficiently inhibit human VKORC1 (i.e., with K_i<0.7 μM). It is thus likely that the use of these molecules during long-term anticoagulation therapy allow VKORC1L1 to still support the VKOR activity in extrahepatic tissues, as previously described for warfarin [10]. The other molecules (i.e., difenacoum, brodifacoum, difethialone) with K_i less than 1 μM are probably able to inhibit VKORC1L1 in extrahepatic tissues and, thus inhibit or at least decrease the gamma-carboxylation of extrahepatic VKDP. The use of some of these molecules during

long-term anticoagulation could lead to serious unwanted side effects due to the undercarboxylation of extrahepatic VKDP such as OC [12], MGP [11], Gas 6 [13]. Fortunately, these molecules are never used in human medicine and are exclusively used for the pest control management.

To pinpoint potential amino acid residues of VKORC1L1 involved in catalysis and/or substrate recognition or responsible for the natural resistance to VKAs of VKORC1L1 in the absence of 3D-structure of VKORC1L1 proteins, we carried out a multiple sequences alignment analysis between VKORC1 and VKORC1L1 proteins. This study allowed us to highlight 1) conserved amino acid residues between VKORC1 and VKORC1L1 potentially involved in catalysis (i.e., Cys-43₍₊₇₎, Cys-51₍₊₇₎, Asp/Glu-130₍₊₇₎, Cys-132₍₊₇₎, Cys-135₍₊₇₎, Tyr-139₍₊₇₎) and/or substrate binding and 2) conserved amino acid residues in VKORC1L1 (i.e., Lys-129₍₊₇₎), but not in VKORC1 (i.e., Tyr-129) that may cause a different susceptibility to VKAs between enzymes. Our analysis was centered on the area surrounding the presumed VKORC1 catalytic site [25,26], in which mutations leading to the most severe resistances to VKA have been detected [3,17,27]. This area was also proposed as putative-warfarin binding site [7,28]. These highlighted residues were subjected to systematic site-directed mutagenesis and we assessed the functional consequences of these mutations.

The Cys-132₍₊₇₎ and Cys-135₍₊₇₎ are totally conserved between VKORC1L1 sequences. These cysteines were also previously shown to be evolutionarily conserved in all known VKORC1 sequences [29]. In VKORC1L1, both cysteines are also in a "CXXC" motif (Figure 2). This motif was shown to be implicated in redox reactions in VKORC1 [30,31] but also in other redox proteins [32]. Recently, from two crystal structures of bacterial homologs captured in different reaction states, the second cysteines of the motif was proposed to link covalently to the C1 of the quinone ring of vit K1>0 [33]. In agreement with these results, mutations of cysteines 132 and 135 in alanine in hVKORC1 lead to an inactivation of the enzyme. In hVKORC1L1, the replacement of Cys-132₍₊₇₎ and Cys-135₍₊₇₎ of the "CXXC" motif by Ala, a non-conservative amino acid residue, totally abolished the VKOR activity. These results suggest the involvement of Cys-132(+7) and Cys-135(+7) in the transfer of the redox power from VKORC1L1 to vitamin K epoxide, as already proposed for VKORC1 [30].

Besides Cys-132 and Cys-135, two other cysteines Cys-43 and Cy-51 are strictly conserved in VKORC1 proteins of vertebrates, *Drosophila*, plants, bacteria and archaea. In VKORC1L1 proteins, both cysteines are also strictly conserved. In bacterial VKOR homologues, both cysteines are present in the predicted luminal loop separating α-helices 1 and 2. These loop cysteines were proposed to reduce the CXXC motif [31,33]. For VKORC1 proteins, there is still a debate between Cys-43 and Cys-51 being involved in the internal electron transfer. Indeed substitutions of Cys-43 or/and Cys-51 by non-conservative residues lead to contradictory results [30,34–36]. To address the functional contribution of both residues in VKORC1L1, Cys-43₍₊₇₎ or Cys-51₍₊₇₎ were replaced by Ala, a non-conservative residue. These mutations totally abolished activity of recombinant VKORC1L1 enzyme, suggesting a crucial role of these conserved residues in the internal electron transfer from the redox protein partner to the internal catalytic site, as suggested recently by Tie et al. [37].

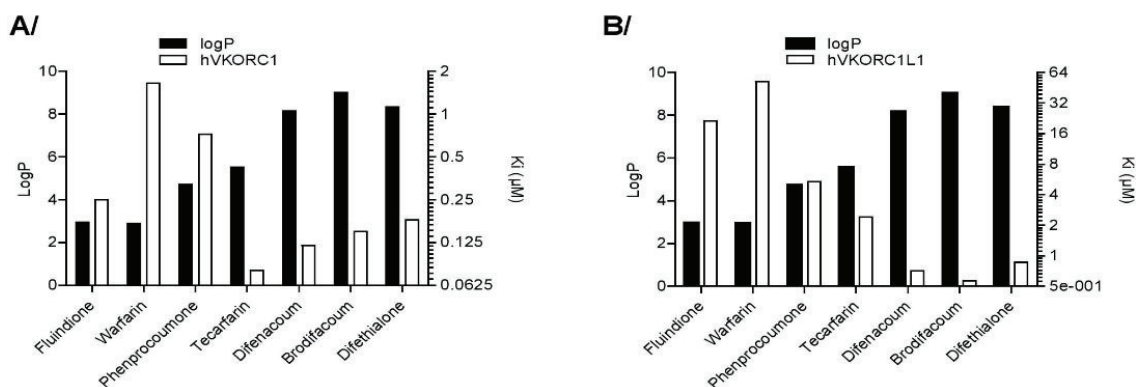


Figure 4 Comparison of inhibition effect of seven anticoagulants on recombinant human VKORC1 and human VKORC1L1, in relation with the hydrophobicity of each anticoagulant represented by LogP. In white are represented the K_i towards anticoagulants, in black are represented the LogP of the anticoagulant.

A theoretical reaction mechanism for converting vitamin K₂ to K by VKOR enzymes was proposed by Silverman based on a chemical model study [38]. This mechanism was revisited later by a quantum chemical study [39]. The theoretical model implied the CXXC catalytic site and one nearby acidic amino acid residue involved in the protonation of the epoxide oxygen. Nevertheless, this proposed reaction mechanism was never experimentally confirmed even for VKORC1 enzymes. In hVKORC1L1, only two acidic amino acid residues Glu-130₍₊₇₎ and Tyr-139₍₊₇₎ are located close to the CXXC catalytic site. Both residues are totally conserved between VKORC1L1 proteins. To explore their respective role in the reaction mechanism of VKORC1L1, non-conservative and conservative mutations of these residues were performed.

The non-conservative substitution of Tyr-139₍₊₇₎ by Ala in hVKORC1L1 totally abolished VKORC1L1 activity, while the conservative substitution of Tyr-139₍₊₇₎ by Phe partially restored VKORC1L1 activity with a K_m similar to wild type VKORC1L1. These results highlight the importance of an aromatic residue at this position. The Tyr-139₍₊₇₎ may be involved in the substrate binding via stacking interaction. Nevertheless, the replacement of this residue by Phe at position 139₍₊₇₎ dramatically impaired the V_{max} and thus the catalytic efficiency. The Tyr-139₍₊₇₎ of VKORC1L1 might be involved in the protonation of the reaction intermediate produced by catalysis, as was proposed for VKORC1 [40]. Finally, even if VKORC1L1 is naturally 30-fold more resistant to VKAs than VKORC1, the replacement of Tyr-139₍₊₇₎ by Phe leads also, as described for VKORC1 [27,41], to an increase of K_i of VKORC1L1 towards VKAs. This result suggests a similarity of VKA-binding sites between VKORC1 and VKORC1L1 and the involvement of Tyr-139₍₊₇₎ in the binding of VKA by VKORC1L1 as proposed for VKORC1 [28].

The non-conservative substitutions of Glu-130₍₊₇₎ by Ala or His in hVKORC1L1 did not modify the VKOR activity. These results are thus not in favor of the involvement of Glu-130₍₊₇₎ in the reaction mechanism of hVKORC1L1 and more precisely in the protonation of the epoxide oxygen. Nevertheless, while the substitution of Glu-130₍₊₇₎ by Ala or His does not modify VKOR activity, the replacement of the same Glu-130₍₊₇₎ by Asp drastically decreases VKOR activity with an activity lower than 20% compared with that of the wild

type enzyme. Therefore the catalytic efficiency of this mutant is extremely decreased while the enzyme-substrate interaction is unchanged (K_m similar to that of the wild type enzyme). This loss of activity is very surprising because in VKORC1 proteins an Asp is present at this corresponding position. The weak activity of VKORC1L1-E130₍₊₇₎D is potentially due to a modification of the steric hindrance of the CXXC catalytic site, leading to a change in the positioning of the substrate in the catalytic site. In view of these surprising results, we then evaluated the susceptibility of the VKORC1L1-E130₍₊₇₎A, -E130₍₊₇₎H, -E130₍₊₇₎D to VKAs. Indeed, the domain surrounding the CXXC motif from Phe-131 to Thr-137 was recently proposed as putative warfarin-binding site for VKORC1 [27]. While VKORC1L1 is naturally very resistant to VKA (30-fold than VKORC1 towards warfarin), the simple substitution of Glu-130₍₊₇₎ by Ala, His or Asp (i.e., the corresponding amino acid found in VKORC1) drastically modified susceptibility to VKAs. Their susceptibility to VKAs becomes similar to that of VKORC1. These results suggest that the natural resistance to VKA of VKORC1L1 is partially due to the steric hindrance of VKA interaction site by the lateral chain of Glu-130₍₊₇₎. Nevertheless, the replacement of Asp-130 by Glu in VKORC1 does not modify the susceptibility of VKORC1 to VKA (data not shown), suggesting structural properties different between VKORC1 and VKORC1L1.

Conclusion

In conclusion, this structure-function study allowed us, 1) to demonstrate the importance of Cys-132₍₊₇₎ and Cys-135₍₊₇₎, but also of Cys-43₍₊₇₎ and Cys-51₍₊₇₎ in the transfer of the redox power from VKORC1L1 to vitamin K epoxide, 2) to compare the susceptibility to all VKAs of VKORC1 and VKORC1L1, 3) to demonstrate the implication of Tyr-139₍₊₇₎ in the interaction of VKORC1L1 with warfarin, 4) to associate the natural resistance of VKORC1L1 to VKA with the steric hindrance of VKA interaction site by the lateral chain of Glu-130₍₊₇₎. Interestingly, a single mutation is able to modify drastically the susceptibility of VKORC1L1 to VKAs.

Acknowledgment

This work was supported by grants from Agence Nationale pour la Recherche (RODENT 2009-CESA-008-03) and by DGER.

References

- Bell RG, Matschiner JT (1970) Vitamin K activity of phylloquinone oxide. *Arch Biochem Biophys* 141: 473-476.
- Li T, Chang CY, Jin DY, Khvorova A, et al. (2004) Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427: 541-544.
- Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V (2004) Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427: 537-541.
- Silverman RB (1980) A model for a molecular mechanism of anticoagulant activity of 3-substituted 4-hydroxycoumarins. *J Am Chem Soc* 102: 5421-5423.
- Hodroge A, Matagrín B, Moreau C, Fourel I, Hammed A, et al. (2012) VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *J Thromb Haemost* 10: 2535-2543.
- Tie JK, Jin DY, Tie K, Stafford DW (2013) Evaluation of warfarin resistance using transcription activator-like effector nuclease-mediated vitamin K epoxide reductase knockout HEK293 cells. *J Thromb Haemost* 11: 1556-1564.
- Czogalla KJ, Biswas A, Wendeln AC, Westhofen P, Müller CR, et al. (2013) Human VKORC1 mutations cause variable degrees of 4-hydroxycoumarin resistance and affect putative warfarin binding interfaces. *Blood* 122: 2743-2750.
- Westhofen P, Watzka M, Marinova M, Hass M, Kirfel G, et al. (2011) Human vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) mediates vitamin K-dependent intracellular antioxidant function. *J Biol Chem* 286: 15085-15094.
- Oldenburg J, Watzka M, Bevans CG (2015) VKORC1 and VKORC1L1: why do vertebrates have two vitamin K_{2,3}-epoxide reductases? *Nutrients* 7: 6250-6280.
- Hammed A, Matagrín B, Spohn G, Prouillac C, Benoit E, et al. (2013) VKORC1L1, an enzyme rescuing the VKOR activity in some extrahepatic tissues during anticoagulation therapy. *J Biol Chem* 288: 28733-28742.
- Price PA, Urist MR, Otawara Y (1983) Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 117: 765-771.
- Price PA, Poser JW, Raman N (1976) Primary structure of the gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 3374-3375.
- Nakano T, Kawamoto K, Kishino J, Nomura K, Higashino K, et al. (1997) Requirement of gamma-carboxyglutamic acid residues for the biological activity of Gas6: contribution of endogenous Gas6 to the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem J* 323: 387-392.
- Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, Kwaijtaal M, Van Diest R, et al. (2005) Novel conformation-specific antibodies against gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1629-1633.
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, et al. (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130: 456-469.
- Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P (2008) Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5266-5270.
- Hodroge A, Longin-Sauvageon C, Fourel I, Benoit E, Lattard V (2011) Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch Biochem Biophys* 515: 14-20.
- Ellis DJ, Usman MH, Milner PG, Canafax DM, Ezekowitz MD (2009) The first evaluation of a novel vitamin K antagonist, tecarfarin (ATI-5923) in patients with atrial fibrillation. *Circulation* 120: 1029-1035.
- Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Videmann B, Billeret M, Berny P, et al. (2005) Warfarin resistance in a French strain of rats. *J Biochem Mol Toxicol* 19: 379-385.
- Grandemange A, Kohn MH, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Berny P, et al. (2009) Consequences of the Y139F Vkorc1 mutation on resistance to AVKs: *in vivo* investigation in a 7th generation of congenic Y139F strain of rats. *Pharmacogenet Genomics* 19: 742-750.
- Fregin A, Czogalla KJ, Gansler J, Rost S, Taverna M, et al. (2013) A new cell culture-based assay quantifies vitamin K_{2,3}-epoxide reductase complex subunit 1 function and reveals warfarin resistance phenotypes not shown by the dithiotreitol-driven VKOR assay. *J Thromb Haemost* 11: 872-880.
- Le Heuzey JY, Ammentorp B, Darius H, De Caterina R, Schilling RJ, et al. (2014) Differences among western European countries in anticoagulation management of atrial fibrillation in Europe. *Thromb Haemost* 111: 833-841.
- Bavisotto LM, Ellis DJ, Milner PG, Combs DL, Irwin I, et al. (2011) Tecarfarin, a novel vitamin K reductase antagonist, is not affected by CYP2C9 and CYP3A4 inhibition following concomitant administration of fluconazole in healthy participants. *J Clin Pharmacol* 51: 561-574.
- Fourel I, Hugnet C, Goy-Thollot I, Berny P (2010) Validation of a new liquid chromatography-tandem mass spectrometry ion-trap technique for the simultaneous determination of thirteen anticoagulant rodenticides, drugs, or natural products. *J Anal Toxicol* 34: 95-102.
- Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R (2005) Engineering of a recombinant vitamin K-dependent gamma-carboxylation system with enhanced gamma-carboxyglutamic acid forming capacity: evidence for a functional CXXC redox center in the system. *J Biol Chem* 280: 10540-10547.
- Tie JK, Nicchitta C, Von Heijne G, Stafford DW (2005) Membrane topology mapping of vitamin K epoxide reductase by *in vitro* translation/cotranslocation. *J Biol Chem* 280: 16410-16416.
- Watzka M, Geisen C, Bevans CG, Sittinger K, Spohn G, et al. (2011) Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: insights into improved patient diagnosis and treatment. *J Thromb Haemost* 9: 109-118.
- Oldenburg J, Bevans CG, Muller CR, Watzka M (2006) Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle. *Antioxid Redox Signal* 8: 347-353.
- Goodstadt L, Ponting CP (2004) Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci* 29: 289-292.
- Jin DY, Tie JK, Stafford DW (2007) A topological study of the human gamma-glutamyl carboxylase. *Biochemistry* 46: 7279-7283.
- Li W, Schulman S, Dutton RJ, Boyd D, Beckwith J, et al. (2010) Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. *Nature* 463: 507-512.

- 32 Holmgren A (1985) Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54: 237-271.
- 33 Liu S, Cheng W, Fowle Grider R, Shen G, Li W (2014) Structures of an intramembrane vitamin K epoxide reductase homolog reveal control mechanisms for electron transfer. *Nat Commun* 5: 3110.
- 34 Rost S, Fregin A, Hünerberg M, Bevans CG, Müller CR, et al. (2005) Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb Haemost* 94: 780-786.
- 35 Rishavy MA, Usubalieva A, Hallgren KW, Berkner KL (2011) Novel insight into the mechanism of the vitamin K oxidoreductase (VKOR): electron relay through Cys43 and Cys51 reduces to allow vitamin K reduction and facilitation of vitamin K-dependent protein carboxylation. *J Biol Chem* 286: 7267-7278.
- 36 Tie JK, Jin DY, Stafford DW (2012) Human vitamin K epoxide reductase and its bacterial homologue have different membrane topologies and reaction mechanisms. *J Biol Chem* 287: 33945-33955.
- 37 Tie JK, Jin DY, Stafford DW (2014) Conserved loop cysteines of vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) are involved in its active site regeneration. *J Biol Chem* 289: 9396-9407.
- 38 Silverman RB (1981) Chemical model studies for the mechanism of vitamin K epoxide reductase. *J Am Chem Soc* 103: 5939-5941.
- 39 Davis CH, Deerfield D, Wymore T, Stafford DW, Pedersen LG (2007) A quantum chemical study of the mechanism of action of vitamin K epoxide reductase. *J Mol Graph Model* 26: 401-408.
- 40 Matagrín B, Hodroge A, Montagut-Romans A, Andru J, Fourel I, et al. (2013) New insights into the catalytic mechanism of vitamin K epoxide reductase (VKORC1)-the catalytic properties of the major mutations of rVKORC1 explains the biological cost associated to mutations. *FEBS Open Bio* 3: 144-150.
- 41 Pelz HJ, Rost S, Hünerberg M, Fregin A, Heiberg AC, et al. (2005) The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* 170: 1839-1847.

8.2.2 Vers un inhibiteur spécifique de VKORC1L1

Sur l'ensemble des molécules présentes dans la chimiothèque, 121 ont été utilisées pour effectuer une estimation de l'IC₅₀ sur l'enzyme VKORC1L1. La méthodologie adoptée pour la détermination de ces IC₅₀ était équivalente à celle mise en place dans l'article présenté précédemment. Parmi les 121 molécules étudiées, 31 d'entre elles présentaient une IC₅₀ inférieure à 1 µM. Cette valeur seuil de 1 µM a été définie pour différencier les molécules potentiellement actives de celles qui ne le sont pas ou peu.

La capacité d'inhibition de ces 31 molécules sur l'activité VKORC1(YY) a également été réalisée. Le facteur de résistance VKORC1L1 / VKORC1(YY) était en moyenne de 22 (±14) pour une médiane de 20,3. Le rapport minimum était de 2,26 et maximum de 60,3. Ces résultats confirment bien la plus grande résistance de VKORC1L1 face aux AVK comparativement à VKORC1 non mutée. Les rapports étant tous supérieurs à 1 aucune de ces molécules ne peut être utilisée pour essayer d'inhiber spécifiquement VKORC1L1 chez les rats non mutés pour le gène VKORC1 (rats SD ou YY).

Les rats CC sont reconnus pour être résistants à certains AVK. Il est probable que parmi les 31 molécules qui fonctionnaient bien sur VKORC1(YY) certaines d'entre elles le soient beaucoup moins sur VKORC1(CC) permettant ainsi une utilisation comme inhibiteur de VKORC1L1 dans la lignée CC. Pour répondre à cette question, ces 31 molécules ont également été testées sur l'enzyme VKORC1(CC). Le facteur de résistance VKORC1L1 / VKORC1(CC) était en moyenne de 1,09 (1,29) pour une médiane de 0,55. Le rapport minimum était de 0,011 et le rapport maximum de 4,23.

Parmi ces 31 molécules, 3 d'entre elles ont retenu notre attention pour leur ratio VKORC1L1/VKORC1(CC) faible et leur structure intéressante.

- La molécule (A) avec le ratio le plus faible de 0,11 pour une IC₅₀ sur VKORC1L1 de 0,187 µM et de 17,0 µM pour VKORC1(CC).
- La molécule (B) avec un rapport de 0,155 pour une IC₅₀ sur VKORC1L1 de 0,898 µM et 5,78 µM pour VKORC1(CC).
- La molécule (C) avec un ratio de 0,026 pour une IC₅₀ sur VKORC1L1 de 0,340 µM et 13,1 µM pour VKORC1(CC).

Pour être un bon inhibiteur *in vivo* ces molécules doivent pouvoir être métabolisées lentement afin d'éviter des administrations trop fréquentes aux animaux. Elles doivent aussi pouvoir présenter une bonne distribution tissulaire, et notamment dans les organes cibles. Cette vitesse d'élimination et cette distribution tissulaire ont été évaluées dans le foie et les testicules 1 jour, 2 jours et 6 jours après un gavage à 5 mg/kg chez des rats SD. Le temps de *quick* a également été mesuré à ces différentes échéances.

Dans le foie, l'inhibiteur « C » se retrouve en très faible quantité (0,72 µg/g) 24h après l'administration. À cette même échéance, des pics correspondant très certainement à des métabolites de ce composé « C » apparaissent à des concentrations importantes (*figure 37a*). Après 6 jours, la concentration hépatique en composé « C » est diminuée de 65% par rapport à J1. Dans les testicules, la concentration est encore plus faible et se situe en dessous des limites de quantifications (<1 µg/g). Le temps de coagulation n'est pas augmenté, quelle que soit l'échéance observée.

Ces résultats indiquent que la molécule « C », même si elle est un bon inhibiteur de VKORC1L1 *in vitro*, ne sera pas capable *in vivo* d'inhiber l'enzyme VKORC1L1 dans les testicules à cause d'une métabolisation trop rapide et une concentration trop faible dans l'organe cible.

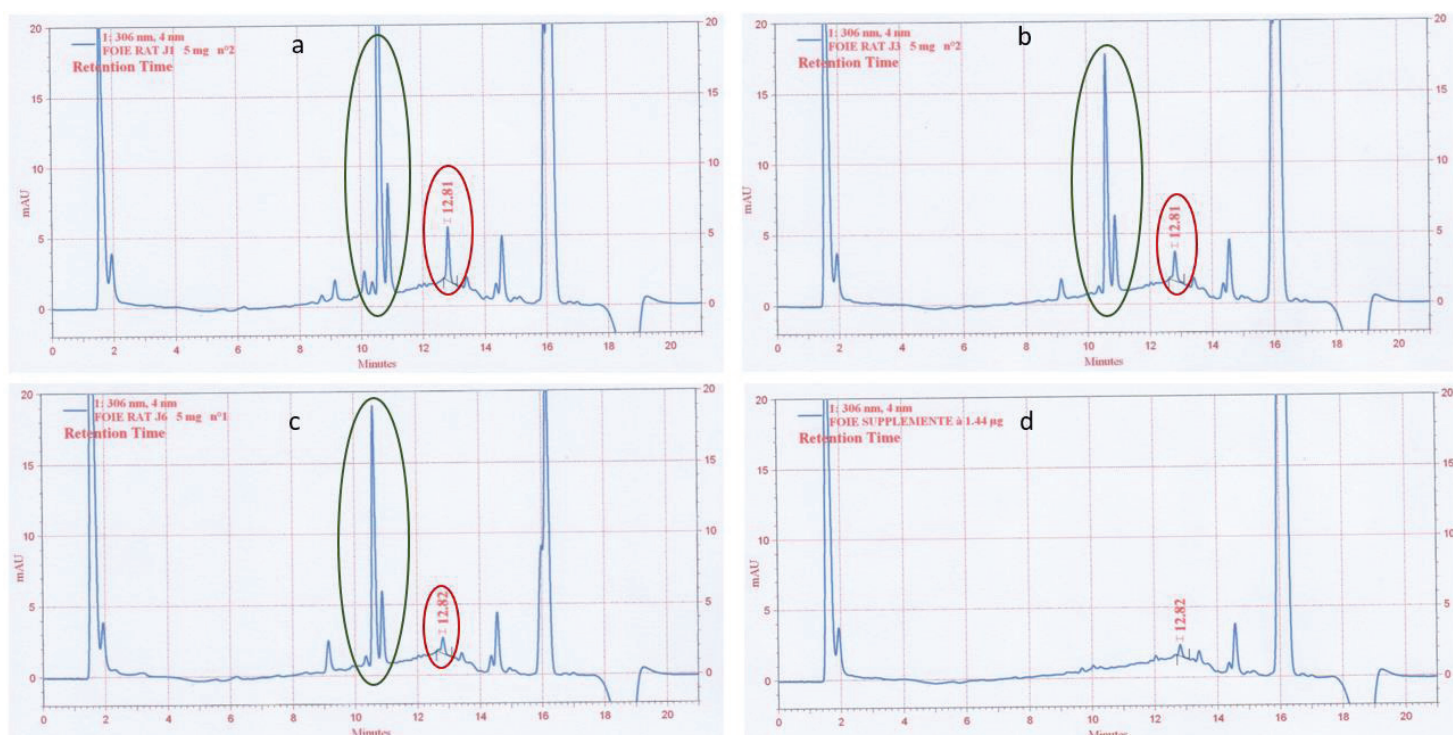


Figure 37 : Exemple de chromatogrammes après 1 jour (a), 2 jours (b) et 6 jours (c) d'administration de 5 mg/kg par gavage de l'inhibiteur "A" de VKORC1L1. (d) foie blanc supplémenté avec 0,144 µg/g de composé « C ». Encerclé en rouge : pic correspondant au composé « C ». Encerclé en vert : métabolites non identifiés du composé « C ».

Concentration en inhibiteur "C" dans le foie

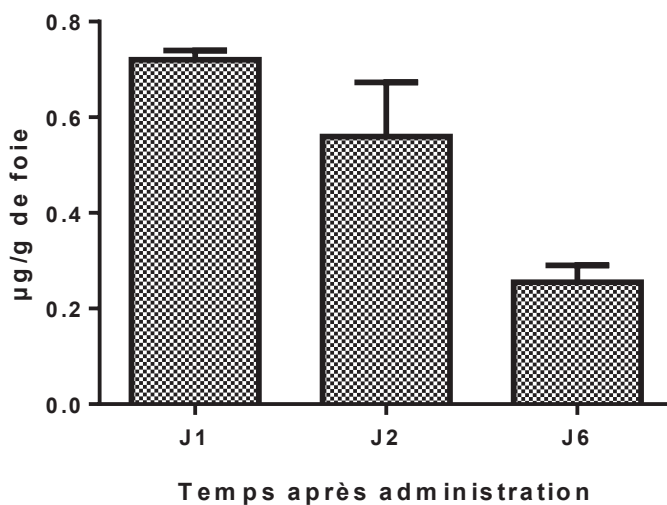


Figure 38 : Concentration hépatique en µg/g de l'inhibiteur "C", 1, 2 et 6 jours après un gavage à 5mg/kg. Résultats exprimés en moyenne (E.T). n = 2 à 3 par groupe.

Les composés « A » et « B » présentent une structure différente au composé « C ». Cette différence structurale pourrait permettre une métabolisation plus lente et une bonne distribution tissulaire et présenter ainsi les caractéristiques requises pour inhiber efficacement VKORC1L1 in vivo. Pour le moment les composés « A » et « B » ne sont plus disponibles en quantité suffisante pour réaliser ces essais. Dans l'attente d'une nouvelle synthèse de ces composés, le travail de screening de la chimiothèque continue pour identifier de nouvelles molécules inhibitrices de VKORC1L1.

8.3 Conclusion

Les calcifications observées dans le modèle de subcarence que nous proposons sur une lignée de rats introgressés (CC) présentent une localisation testiculaire caractéristique. Cette localisation n'a jamais été retrouvée dans les modèles de calcification utilisant des AVK. La publication de Hammed A et al. (2013) a démontré que VKORC1L1 est, en particulier, présent dans le testicule et que VKORC1L1 est peu sensible à la warfarin. Néanmoins, très peu de travaux ont, à ce jour, été publiés sur cette enzyme et il manquait de nombreuses informations relatives à la résistance de cette enzyme. Ce travail a été réalisé et a fait l'objet de la publication jointe. Cette publication montre que pour l'ensemble des molécules AVK commerciales VKORC1L1 est clairement plus résistante que VKORC1. Nous avons ajouté à cette publication des résultats préliminaires sur le screening d'une chimiothèque de dérivés

coumariniques inhibiteurs de VKORC1. Aucune molécule « screenée » n'a présenté une activité d'inhibition de VKORC1L1 supérieure à VKORC1. Dans la mesure où notre modèle est basé sur des rats présentant une VKORC1 mutée en Y139C, il est nécessaire, *a minima*, de disposer d'un inhibiteur peu efficace sur VKORC1 (CC) mais efficace sur VKORC1L1. Trois molécules ont présenté ce profil souhaité. Néanmoins, un inhibiteur utilisable *in vivo* doit atteindre sa cible avec une forte concentration et une présence importante. De plus, il est également important que les concentrations hépatiques obtenues ne soient pas inhibitrices de la synthèse des facteurs de coagulation. Ces points relevant de la pharmacocinétique sont en suspens actuellement.

L'enzyme VKORC1L1 est beaucoup plus résistante que l'enzyme VKORC1 face aux différents AVK. Il est par conséquent difficile de trouver un inhibiteur spécifique de VKORC1L1. Chez les rats CC la différence de résistance entre VKORC1 et VKORC1L1(CC) est beaucoup plus faible et parfois inversée. Chez ces rats il serait donc possible de trouver un inhibiteur spécifique de VKORC1L1. Un tel inhibiteur permettrait de mieux comprendre les rôles de VKORC1L1 dans les tissus extrahépatiques l'exprimant fortement et permettrait de voir son implication ou non dans le développement des calcifications vasculaires. La réalisation d'un KO VKORC1L1 serait une solution beaucoup plus efficace pour atteindre ce but, mais aucune équipe de recherche n'a encore développé ce modèle d'étude.

9 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de thèse était de proposer et de caractériser un modèle de subcarence en vitamine K chez le rat, permettant d'établir de façon claire un lien de causalité entre cette subcarence et l'apparition de calcifications vasculaires.

Pour satisfaire cette exigence, la restriction en vitamine devait (i) entraîner une forte diminution de l'activité des PVKD extrahépatiques impliqués dans l'inhibition des calcifications vasculaires et (ii) maintenir une activité suffisante aux facteurs de la coagulation vitamine K dépendant pour assurer le maintien de l'hémostase.

Dans cette discussion, la partie sur le modèle de subcarence ainsi que la partie plus spécifique des calcifications vasculaires seront donc abordées.

9.1 Carence en vitamine K

Dans ce travail de thèse, deux régimes pauvres en vitamine K ont été créés. Un régime était de type naturel avec le remplacement de l'orge, qui pouvait être une source de PK, par de l'amidon de maïs et le second était de type synthétique avec utilisation d'ingrédients limitants au maximum les apports en vitamine K. Dans ce dernier régime, seule la caséine n'a pas pu être remplacée et est reconnue comme pouvant apporter une part non négligeable de PK dans l'alimentation des rongeurs de laboratoire (Fu et al., 2007). Ces 2 régimes sans ménadione présentaient une concentration en vitamine K (MK4 + PK) inférieure à 20 ng/g ce qui est normalement insuffisant pour maintenir une coagulation normale chez le rat mâle SD. Dans les différentes expérimentations aucune modification de la coagulation n'est cependant observée après 16 jours de carence chez les rats SD et après 3 mois chez les rats YY. Si la coagulation est maintenue, c'est que ces rats tirent leur apport en vitamine K dans une autre source que l'alimentation.

Au cours de la carence, le dosage hépatique de la vitamine K montre une absence de PK ce qui est un résultat attendu puisque cette forme est absente de l'alimentation et ne peut pas être synthétisée *de novo*. En accord avec d'autres études sur la carence, la MK4 est également absente ou présente en dessous de la limite de quantification dans le foie. L'analyse du chromatogramme montre la présence d'un pic important indiquant une forte concentration de ce qui pourrait être une MK à longue chaîne. Ce composé est élué après la MK7 ce qui laisse à penser qu'il s'agirait d'une MK8, MK9 ou MK10, mais l'absence de standards empêche son identification précise.

Ces MK à longues chaînes peuvent être synthétisées par les bactéries de type *bactéroïdes* et *bifidobacteria* dans la partie distale du tube digestif (Koivu-Tikkanen et al., 2000) (Conly and

Stein, 1992). Cette synthèse est effectuée même en absence de PK ou de MD alimentaire et représenterait une quantité de 6 µg/rat au niveau du gros intestin (Uchida et al., 1986). Dans cette partie du tube digestif l'absence de sels biliaires rend difficile l'absorption des nutriments et encore plus du fait de la longueur importante de la chaîne latérale prényle rencontrée. Une majorité de ces MK se retrouvent alors dans les fécès pour une quantité estimée à 10-20 µg par jour. Cette quantité serait suffisante pour répondre aux besoins quotidiens des animaux. Les rats sont des animaux coprophages, et cette activité qui concerne plus de 50 % de leurs fécès leur garanti en milieu naturel un apport indispensable en vitamine B12 et acide folique (Ebino, 1993). Dans le cas des expérimentations en carence réalisées au cours de ce travail de thèse, les animaux puisent une petite partie de la vitamine K dans l'alimentation et par la réingestion de leurs fécès. Les MK avec une chaîne latérale supérieure à 6 unités prényles (MK6) ne montrent presque plus d'activité GGX contrairement à la PK et aux autres MK (Buitenhuis et al., 1990b). Des travaux préliminaires réalisés à l'USC1233 montreraient également une absence d'activité VKOR lorsque les MK à longues chaînes sont utilisées comme co-substrat. Bien que non-active *in vitro*, les MK à longue chaîne comme la MK9 permettent *in vivo* d'améliorer la coagulation chez des rats ayant une hypothyroïdisme (Akiyama et al., 1995). Cette amélioration reste moins importante qu'avec la MK4 et la PK (Will et al., 1992). Pour exercer leur activité *in vivo* ces MK à longues chaînes sont clivées dans un premier temps puis prénylées par UBIAD1 pour être converties en MK4 directement utilisable par les différents tissus de l'organisme.

L'absence de modification de la coagulation et de calcification vasculaire chez les rats SD et YY montre que les besoins en vitamine K sont entièrement assurés pour ces animaux bien que la carence entraîne une diminution de la concentration en MK4 tissulaire (MK4 testiculaire). Pour obtenir une réelle carence chez ces rats il faudrait, soit totalement prévenir la coprophagie ce qui n'est possible qu'en utilisant un dispositif contraignant comme celui utilisé dans l'étude de Ohta A en 1996 (Ohta et al., 1996), soit remplacer 50% de l'alimentation carencée par du riz blanc. Ces méthodes ne sont pas idéales et aboutissent à un état de carence avancée entraînant l'apparition de syndromes hémorragiques et une forte mortalité. Ces stratégies ne permettent donc pas d'établir un modèle d'étude de subcarence et de ses calcifications associées.

Les rats CC présentent un cycle de la vitamine K incomplet avec production *in vitro* et *in vivo* de 3-OH-vitamine K qui est un métabolite inactif (Preusch and Suttie, 1984), (Fasco et al., 1983), (Matagrín et al., 2013). La perte en vitamine K, consécutive à ce métabolisme anormal, se traduit par des besoins fortement augmentés. La coprophagie ne permet plus dans ce cas de compléter les apports alimentaires et les rats présentent alors une diminution de l'activité du facteur II, une légère augmentation du temps de quick, une très forte diminution (limite de quantification) de la vitamine K tissulaire (MK4 testiculaire), une augmentation de l'ucOC

plasmatique, une augmentation de l'ucMGP tissulaire et la progression de calcifications vasculaires. Ces altérations de la coagulation restent relativement faibles et ne s'accompagnent pas d'effet clinique notable (quelques rares cas de mortalité par hémorragie sont tout de même relevés).

De manière surprenante bien que la MGP se retrouve sous sa forme non-gamma-carboxylée chez ces rats CC subcarencés, les facteurs de la coagulation restent assez faiblement impactés. Une explication possible est que le foie, qui est le premier organe assurant la filtration de la circulation veineuse intestinale *via* la veine porte, capte en premier le peu de vitamine K disponible issue de l'alimentation ou de la coprophagie. Il l'utilise alors directement pour les besoins de la synthèse des PVKD hépatiques représentés par les facteurs de la coagulation. La fonction vitale de coagulation est alors maintenue au détriment de la fonction d'inhibition des calcifications vasculaires assurée par des PVKD extrahépatiques comme la MGP.

La concentration en ucOC plasmatique augmente également au cours de la subcarence des rats CC. L'ostéocalcine est une des principales protéines non-collagéniques de l'os (Price et al, 1976). Il s'agit d'une PVKD synthétisée par les ostéoblastes. Sous sa forme gamma-carboxylée (cOC), l'ostéocalcine présente une forte affinité pour le calcium, se fixant ainsi à l'hydroxyapatite de l'os. Son rôle dans l'os reste néanmoins obscur. Des études récentes ont proposé que sous sa forme non gamma-carboxylée (ucOC) elle agirait en fait comme une hormone produite par l'os en jouant un rôle majeur dans la régulation du métabolisme glucidique (Lee et al, 2007; Ferron et al, 2008; Ferron et al, 2012). L'ucOC peut être soit produite non-gamma-carboxylée, soit être dégamma-carboxylée. Elle est alors libérée dans la circulation plasmatique, et pourrait ainsi assurer la communication entre le tissu osseux, le pancréas et le tissu adipeux. Sous sa forme ucOC, elle stimule la sécrétion d'insuline par le pancréas, stimule la sécrétion d'adiponectine par le tissu adipeux et rend en même temps ce dernier plus sensible à l'action de l'insuline (Lee et al, 2007; Ferron et al, 2008; Ferron et al, 2012). L'ucOC serait donc une hormone hypoglycémisante. Bien que démontré au niveau mécanistique uniquement chez la souris, il semble que cette hypothèse puisse aussi être vérifiable chez l'Homme comme le suggère plusieurs études cliniques qui mettent en relation le rapport ucOC/cOC circulant et différents paramètres métaboliques (masse corporelle, masse adipeuse, obésité, glycémie, insulinémie, diabète de type 2, adiponectinémie...) (Movahed et al, 2012 ; Lu et al, 2012 ; Abseyi et al, 2012 ; Bao et al, 2012). Certains résultats restent néanmoins contradictoires et le lien causal entre la production d'ucOC et de cOC et la régulation de l'homéostasie glucidique reste à établir.

Comme il a déjà été décrit dans la littérature, les femelles sont moins sensibles à la carence que les mâles (Mameesh and Johnson, 1959), (Metta and Johnson, 1960) (Huber et al., 1999)

ce qui se traduit ici par un maintien de l'activité des facteurs de la coagulation vitamines K dépendant proche de 100% et de calcifications vasculaires moins importantes. Les différentes explications face à cette résistance incluent celles (i) d'un besoin plus important en vitamine K chez les mâles que la femelle (ii) d'une coprophagie plus grande chez la femelle (iii) des effets des hormones sexuelles (iv) d'une meilleure absorption intestinale et/ou (v) d'une plus grande production de MK par le microbiote (Huber et al., 1999).

En 2016 Yanni Mi a proposé un modèle de carence en vitamine K chez le rat mâle SD en administrant quotidiennement en plus d'un régime carencé en vitamine K, une dose de 30 mg/kg de gentamicine pendant 2, 3 et 4 semaines (Mi et al., 2016). Dans ce modèle l'utilisation d'antibiotique permet de limiter la production de MK par la flore digestive et induit une diminution de l'activité du facteur II et du temps de quick. Ces variations sont plus faibles que dans le modèle du rat CC subcarencé et apparaissent plus tardivement (après 21 à 28 jours de traitement). Le gavage quotidien répété à la gentamicine reste un geste contraignant à la fois pour les animaux et l'expérimentateur. Enfin dans cette étude aucune information n'est communiquée sur l'évolution de la vitamine K tissulaire ni sur l'apparition d'éventuelles calcifications vasculaires.

La vitamine E (alpha-tocophérol) peut accentuer la carence en vitamine K en rentrant en compétition avec elle dans l'absorption intestinale (Farley et al., 2012) et certains auteurs supplémentent l'alimentation en alpha-tocophérol pour essayer d'accentuer les effets d'un régime carencé. L'utilisation d'animaux axéniques permet d'empêcher la synthèse de MK dans le tube digestif et permet encore une fois de diminuer les apports en vitamine K chez ces animaux.

Le recours aux antibiotiques, à la vitamine E, et aux animaux axéniques pourrait être envisagé dans le but d'optimiser l'état de subcarence des rats CC utilisés dans ce travail de thèse.

À la vue de l'ensemble de ces éléments, l'administration d'un régime déficient en vitamine K chez les rats mâles CC constitue un bon modèle de subcarence en vitamine K. Cela est possible grâce à un recyclage incomplet de cette vitamine qui se traduit par des besoins augmentés chez ces animaux. Cette subcarence permet le maintien de la fonction vitale de la coagulation, mais est suffisante pour induire des modifications notables sur la gamma-carboxylation de la MGP et de l'ostéocalcine.

Le niveau de gamma-carboxylation des autres PVKD comme Gas6, la périostine ou la transthyrétine devrait également être altéré dans ce modèle. Des modifications du métabolisme osseux et énergétique pourraient alors apparaître spécifiquement chez ces animaux et pourraient être étudiées.

9.2 Calcifications vasculaires

Après 3 mois de régime sans ménadione tous les rats mâles CC présentent des calcifications de la média artérielle. Ces calcifications sont détectées dans les poumons et la crosse aortique par μ CT comme cela a déjà été observé chez des rats recevant des doses importantes de warfarine (Price et al., 1998).

De manière étonnante des calcifications importantes sont également observées pour la première fois par μ CT et par coloration de von-kossa dans les testicules de ces rats. Cet organe semble être particulièrement sensible aux calcifications induites par une subcarence en vitamine K et la MK4 dans ce tissu est normalement présente en quantité importante comparativement aux autres organes. Cette sensibilité n'a jusqu'à ce jour jamais été reportée même dans le modèle de calcification basé sur l'utilisation de warfarine (Price et al., 1998). En plus d'avoir une forte concentration en MK4, les testicules présentent un niveau d'expression important d'enzyme UBIAD1 permettant la synthèse de MK4 *de novo* et une bonne activité GGcX. L'activité VKOR est également importante avec une participation de VKORC1L1 à hauteur de 50% de cette activité ce qui en fait l'organe dont l'activité VKORC1L1 est la plus forte (devant le foie, les reins, les poumons et le cerveau) (Hammed et al., 2013). Ces éléments laissent à penser que la vitamine K pourrait jouer un rôle important dans cet organe autre que celui d'être un cofacteur de la GGcX pour l'activation des différentes PVKD. La MK4 pourrait par exemple permettre la régulation de certains gènes (Tabb et al., 2003) ou la stimulation d'AMPc (Otsuka et al., 2004).

Différentes études de l'équipe de Michio Komai montrent que la carence en vitamine K chez les rats entraîne une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et des hormones stéroïdiennes comme le Cyp11a. Ces mêmes rats présentent une diminution testiculaire et plasmatique en testostérone sans modification du taux plasmatique de l'hormone lutéinisante (Shirakawa et al., 2006). Ces résultats montrent une action directe de la vitamine K sur la production de testostérone. La testostérone est synthétisée par les cellules de Leydig dans les testicules. Le dosage plasmatique de la testostérone dans les différentes expérimentations de ce travail de thèse n'a cependant jamais réussi à mettre en évidence une relation entre carence et sécrétion de cette hormone. La testostérone est une hormone pulsatile et il est possible qu'un aspect méthodologique manquant empêche l'observation de ce phénomène dans ce travail. Le dosage direct de la testostérone testiculaire devrait limiter les variations circadiennes et pourrait permettre d'observer un effet de la subcarence sur ce paramètre.

Les autres tissus observés dans les différentes expérimentations comme le foie et les reins sont moins sensibles aux calcifications médiales. Bien que la concentration en calcium

augmente dans ces tissus, les calcifications ne sont pas visibles par μ CT. Des techniques plus sensibles que le μ CT sont nécessaires pour pouvoir les observer. Il est également possible que la concentration en calcium et phosphate dans ces tissus soit insuffisante pour induire l'apparition de ces calcifications ou que les mécanismes d'inhibitions soient encore assez bien préservés.

Les calcifications médiales observées sont dues, au moins en partie, à une très forte diminution de gamma-carboxylation de la MGP. En effet, il existe une corrélation positive systématique entre l'accumulation de calcium tissulaire et le score de MGP non-gamma-carboxylée. Le rôle primordial de la MGP dans le processus d'inhibition des calcifications est largement accepté sans que le mécanisme d'action ne soit clairement déterminé. La MGP pourrait agir en se fixant directement sur les cristaux d'hydroxyapatite en formation, en agissant indirectement avec BMP2 ou encore par d'autres mécanismes inconnus. L'absence d'activation de la MGP due à une carence en vitamine K peut facilement expliquer le développement des calcifications artérielles observées chez les rats CC subcarencés. D'un point de vue cellulaire, il serait intéressant de réaliser une culture primaire des VSMC issus de l'aorte des rats CC afin d'étudier le processus de différenciation de ces VSMC en OST-L induit par une carence en vitamine K du milieu de culture.

La GRP est également présentée comme un inhibiteur de calcifications vasculaires sous sa forme gamma-carboxylée (Viegas et al., 2009). Elle s'accumule dans les mêmes zones que la MGP, mais elle reste moins étudiée et décrite dans la littérature. Le développement d'outils moléculaires spécifiques à la GRP du rat permettrait d'évaluer plus en détail le rôle de cette PVKD comme inhibiteur de calcifications vasculaires dans notre modèle.

Chez des rats mâles présentant des calcifications médiales induites par l'administration de warfarine, l'administration de MK4 sur plusieurs semaines permettrait de reverser ces calcifications (Schurgers et al., 2007b). Une étude similaire a été réalisée au cours de ce travail de thèse (non présentée) avec utilisation des rats CC subcarencés pour l'induction des calcifications. Les résultats observés n'ont pas permis d'aboutir à la même conclusion que celle évoquée dans l'étude citée précédemment sur la capacité de la PK et de la MK4 à reverser ces calcifications. Une forte variabilité sur le niveau des calcifications était retrouvée entre les animaux. De plus le régime A04 standard avec ménadione permettait d'observer les mêmes effets qu'avec une administration quotidienne de PK ou MK4. Si la cMGP permet d'inhiber les calcifications, il n'a jamais été montré sa capacité à éliminer des calcifications déjà présentes. Les rats utilisés dans ces études sont jeunes, la croissance n'est pas terminée et le volume des différents organes continue d'augmenter. Si des calcifications sont présentes et arrêtent de progresser, mais que l'organe lui continue sa croissance alors on notera une diminution relative des calcifications sans qu'aucun phénomène spécifique ne soit responsable de cette réversibilité. De nouvelles études sont à mener pour comprendre si la réversibilité des

calcifications vasculaires par la vitamine K est effectivement un phénomène actif. Dans ce cas-là il serait intéressant de pouvoir développer et tester des nouvelles molécules permettant cette réversibilité. Le modèle CC qui est plus proche physiologiquement de la réalité de la subcarence que le modèle warfarine plus vitamine K pourra aider à répondre à cette question.

Les calcifications médiales ont été pendant longtemps caractérisées comme étant un phénomène passif. On sait aujourd'hui que ces calcifications sont le fruit de régulations fines et complexes. Elles ne sont normalement pas accompagnées d'inflammation comme dans le cas de l'athérosclérose. Elles entraînent cependant une diminution de la compliance artérielle ce qui va engendrer une résistance à l'écoulement. Ces résistances vont favoriser l'apparition d'hypertension et une augmentation du risque cardiovasculaire. Il est probable que les rats CC présentent également une certaine élévation de leur pression artérielle. En réponse à cette augmentation de la pression artérielle, il est possible qu'une angiogenèse se mette en place avec une augmentation de la microcirculation notamment dans les tissus très affectés par les calcifications et bien vascularisés comme les testicules. Des études avec une approche physiologique sont à mener dans ce sens.

Les modèles animaux de subcarence en vitamine K pour étudier les phénomènes de calcification vasculaire sont manquants dans la littérature. Des rats traités à la warfarine à raison de 100 mg/kg/jour présentent des calcifications vasculaires, mais seulement sur les animaux en croissance et moins sur les animaux âgés. De plus, le dosage nécessaire pour induire les calcifications est d'ordre pharmacologique et implique l'utilisation d'une forte dose quotidienne de phylloquinone pour éviter la mort par hémorragie des animaux.

Le rat CC est un modèle beaucoup plus simple à mettre en place et plus proche de la réalité physiologique de la subcarence en vitamine K. Quand ces rats sont maintenus dans des conditions standard d'hébergement et de nourriture, ils ne présentent pas de calcification, la reproduction et la croissance sont normales, ils ne présentent pas de trouble de la coagulation ni de modification des paramètres biochimiques. L'apparition des calcifications ne nécessite aucune autre intervention sur l'animal que la mise en régime sans ménadione. Cela permet de réduire les actes sur les animaux ce qui améliore la prise en charge du bien-être animal et libère un temps important aux zootechniciens.

Le rat CC est le premier modèle non invasif permettant le développement et l'étude de calcifications vasculaires médiales par l'induction d'un état de subcarence en vitamine K. Ce modèle pourrait aider à la meilleure compréhension de ces phénomènes retrouvés au cours du diabète, de l'insuffisance rénale chronique et du vieillissement chez l'Homme.

10 CONCLUSIONS GENERALE

L'objectif de cette thèse était de proposer et de caractériser un modèle de subcarence en vitamine K chez le rat qui permet le maintien d'une coagulation suffisante tout en permettant l'observation de calcifications vasculaires.

Pour répondre à cet objectif une lignée des rats possédant une mutation simple sur le gène *Vkorc1* a été créée par introgression sur 10 générations à partir de rats sauvages mutés et de rats SD de laboratoire. Les rats issus de ce croisement présentaient des besoins augmentés en vitamine K tout en gardant les caractéristiques des rats SD. Cette augmentation des besoins est due à un recyclage moins efficace de la vitamine K par l'enzyme *Vkorc1* que chez les rats non mutés.

L'administration d'un régime standard de laboratoire sans ménadione pendant plusieurs semaines chez les rats mâles de cette lignée se traduit par une diminution de l'activité des facteurs de la coagulation vitamines K dépendants mais la coagulation reste cependant maintenue. Une augmentation importante de l'ucOC plasmatique et de l'ucMGP tissulaire et également observée et s'accompagnent de l'apparition de calcifications médiales des parois vasculaires. Ces calcifications sont retrouvées de manière importante dans les poumons, l'aorte et les testicules et progressent avec la durée du régime. Ces modifications biologiques ne sont observées que si l'on associe les deux éléments : rats CC et alimentation sans ménadione. Cette alimentation chez le rat SD ou une alimentation usuelle chez le rat CC ne provoquent pas ces calcifications.

Ces calcifications médiales sont également retrouvées chez l'Homme dans le cadre du diabète de type II, de l'insuffisance rénale chronique ou encore au cours du vieillissement. Le modèle développé dans ce travail pourrait aider à une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans le développement de ce type d'affection et notamment sur le rôle des PVKD inhibitrices des calcifications comme la MGP ou la GRP.

Ces calcifications sont la partie visible et facilement observable de la conséquence de la subcarence en vitamine K dans ce modèle. Il existe cependant de fortes probabilités pour que le niveau de gamma-carboxylations des autres PVKD comme la périostine, Gas6 ou la transthyréline, soit également affecté par cette subcarence.

Contrairement à d'autres modèles de calcifications existants, aucune manipulation sur l'animal n'est requise dans ce modèle, à part la mise sous une alimentation standard sans ménadione pendant plusieurs semaines. Cela permet de maintenir le bien-être animal en diminuant les actes expérimentaux garantissant ainsi le principe de « raffinement » de la règle des 3R.

Il est difficile d'étudier les rôles de la vitamine K chez l'Homme et chez le rat à cause d'un recyclage très efficace. De nouvelles études sont à mener avec ce modèle de subcarence

pour mieux comprendre le rôle de la vitamine K, dans la régulation de l'équilibre énergétique, la prévention des calcifications vasculaires, la réponse à l'inflammation ou encore son lien avec la production de testostérone. Ce modèle peut également être utilisé pour évaluer les adaptations circulatoires mises en jeu en réponse aux calcifications médiales. Le lien potentiel entre calcifications médiales et athérosclérose pourra également être envisagé.

Enfin ce travail de thèse a permis de montrer pour la première fois et de manière forte l'existence d'une relation entre mutation du gène *VKORC1* et calcifications vasculaires. Des SNP sur le gène *VKORC1* peuvent également exister chez l'Homme et il est probable dans ces populations les besoins en vitamines K soient spécifiquement augmentés.

11 BIBLIOGRAPHIE

- Akiyama, Y., Hara, K., Matsumoto, A., Takahashi, S., and Tajima, T. (1995). Comparison of intestinal absorption of vitamin K₂ (menaquinone) homologues and their effects on blood coagulation in rats with hypoprothrombinaemia. *Biochem. Pharmacol.* *49*, 1801–1807.
- Al Za'abi, M., Al Busaidi, M., Yasin, J., Schupp, N., Nemmar, A., and Ali, B.H. (2015). Development of a new model for the induction of chronic kidney disease via intraperitoneal adenine administration, and the effect of treatment with gum acacia thereon. *Am. J. Transl. Res.* *7*, 28–38.
- Alexopoulos, N., and Raggi, P. (2009). Calcification in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* *6*, nrcardio.2009.165.
- Allison, M.A., Criqui, M.H., and Wright, C.M. (2004). Patterns and risk factors for systemic calcified atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 331–336.
- Azuma, K., Tsukui, T., Ikeda, K., Shiba, S., Nakagawa, K., Okano, T., Urano, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Ikawa, M., et al. (2014). Liver-specific γ -glutamyl carboxylase-deficient mice display bleeding diathesis and short life span. *PLoS One* *9*, e88643.
- Bajwa, G.S., Morrison, L.M., and Ershoff, B.H. (1971). Induction of aortic and coronary atherosclerosis in rats fed a hypervitaminosis D, cholesterol-containing diet. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* *138*, 975–982.
- Basset, G.J., Latimer, S., Fatihi, A., Soubeyrand, E., and Block, A. (2016). Phylloquinone (Vitamin K₁): Occurrence, Biosynthesis and Functions. *Mini Rev. Med. Chem.*
- Bell, R.G., and Matschiner, J.T. (1970). Vitamin K activity of phylloquinone oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* *141*, 473–476.
- Berkner, K.L., and Runge, K.W. (2004). The physiology of vitamin K nutrition and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost. JTH* *2*, 2118–2132.
- Bevans, C.G., Krettler, C., Reinhart, C., Watzka, M., and Oldenburg, J. (2015). Phylogeny of the Vitamin K_{2,3}-Epoxide Reductase (VKOR) Family and Evolutionary Relationship to the Disulfide Bond Formation Protein B (DsbB) Family. *Nutrients* *7*, 6224–6249.
- Binkley, S.B., Maccubquodale, D.W., Thayer, S.A., and Doisy, E.A. (1939). The isolation of vitamin K₁. *J. Biol. Chem.* *130*, 219–234.
- Blake, C.C., and Oatley, S.J. (1977). Protein-DNA and protein-hormone interactions in prealbumin: a model of the thyroid hormone nuclear receptor? *Nature* *268*, 115–120.
- Blake, C.C., Geisow, M.J., Swan, I.D., Rerat, C., and Rerat, B. (1974). Structure of human plasma prealbumin at 2.5 Å resolution. A preliminary report on the polypeptide chain conformation, quaternary structure and thyroxine binding. *J. Mol. Biol.* *88*, 1–12.
- Blomstrand, R., and Forsgren, L. (1968). Vitamin K₁-3H in man. Its intestinal absorption and transport in the thoracic duct lymph. *Int. Z. Vitaminforschung Int. J. Vitam. Res. J. Int. Vitaminol.* *38*, 45–64.

- Boitet, M., Hamed, A., Chatron, N., Debaux, J.V., Benoit, E., and Lattard, V. (2017). Elevated difenacoum metabolism involved in the difenacoum-resistant phenotype observed in Berkshire rats homozygous for the L120Q mutation in *Vkorc1* gene. *Pest Manag. Sci.*
- Booth, S.L. (2009). Roles for vitamin K beyond coagulation. *Annu. Rev. Nutr.* 29, 89–110.
- Booth, S.L., and Suttie, J.W. (1998). Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J. Nutr.* 128, 785–788.
- Booth, S.L., Sadowski, J.A., Weihrauch, J.L., and Ferland, G. (1993). Vitamin K1 (Phylloquinone) Content of Foods: A Provisional Table. *J. Food Compos. Anal.* 6, 109–120.
- Booth, S.L., Pennington, J.A., and Sadowski, J.A. (1996). Dihydro-vitamin K1: primary food sources and estimated dietary intakes in the American diet. *Lipids* 31, 715–720.
- Brodeur, M.R., Bouvet, C., Barrette, M., and Moreau, P. (2013). Palmitic acid increases medial calcification by inducing oxidative stress. *J. Vasc. Res.* 50, 430–441.
- Buitenhuis, H.C., Soute, B.A.M., and Vermeer, C. (1990a). Comparison of the vitamins K1, K2 and K3 as cofactors for the hepatic vitamin K-dependent carboxylase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1034, 170–175.
- Buitenhuis, H.C., Soute, B.A., and Vermeer, C. (1990b). Comparison of the vitamins K1, K2 and K3 as cofactors for the hepatic vitamin K-dependent carboxylase. *Biochim. Biophys. Acta* 1034, 170–175.
- Byon, C.H., Javed, A., Dai, Q., Kappes, J.C., Clemens, T.L., Darley-Usmar, V.M., McDonald, J.M., and Chen, Y. (2008). Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 15319–15327.
- Cavaco, S., Viegas, C.S.B., Rafael, M.S., Ramos, A., Magalhães, J., Blanco, F.J., Vermeer, C., and Simes, D.C. (2016). Gla-rich protein is involved in the cross-talk between calcification and inflammation in osteoarthritis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 1051–1065.
- Chatron, N., Chalmond, B., Trouvé, A., Benoit, E., Caruel, H., Lattard, V., and Tchertanov, L. (2017). Identification of the functional states of human vitamin K epoxide reductase from molecular dynamics simulations. *RSC Adv.* 7, 52071–52090.
- Chatrou, M.L.L., Reutelingsperger, C.P., and Schurgers, L.J. (2011). Role of vitamin K-dependent proteins in the arterial vessel wall. *Hamostaseologie* 31, 251–257.
- Collins, M.D., and Jones, D. (1981). Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol. Rev.* 45, 316–354.
- Conly, J.M., and Stein, K. (1992). Quantitative and qualitative measurements of K vitamins in human intestinal contents. *Am. J. Gastroenterol.* 87, 311–316.
- Coutu, D.L., Wu, J.H., Monette, A., Rivard, G.-E., Blostein, M.D., and Galipeau, J. (2008). Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. *J. Biol. Chem.* 283, 17991–18001.
- Czogalla, K.J., Biswas, A., Höning, K., Hornung, V., Liphardt, K., Watzka, M., and Oldenburg, J. (2016). Warfarin and vitamin K compete for binding to Phe55 in human VKOR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 77–85.

- Dam, H. (1935). The antihæmorrhagic vitamin of the chick. *Biochem. J.* *29*, 1273–1285.
- Dam, H., and Schönheyder, F. (1934). A deficiency disease in chicks resembling scurvy. *Biochem. J.* *28*, 1355–1359.
- Dam, H., and Schønheyder, F. (1936). The occurrence and chemical nature of vitamin K. *Biochem. J.* *30*, 897–901.
- Dao, H.H., Essalihi, R., Bouvet, C., and Moreau, P. (2005). Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc. Res.* *66*, 307–317.
- Davidson, K.W., Booth, S.L., Dolnikowski, G.G., and Sadowski, J.A. (1996). Conversion of Vitamin K1 to 2',3'-Dihydrovitamin K1 during the Hydrogenation of Vegetable Oils. *J. Agric. Food Chem.* *44*, 980–983.
- De Vilder, E.Y.G., Debacker, J., and Vanakker, O.M. (2017). GGXX-Associated Phenotypes: An Overview in Search of Genotype-Phenotype Correlations. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Denisova, N.A., and Booth, S.L. (2005). Vitamin K and sphingolipid metabolism: evidence to date. *Nutr. Rev.* *63*, 111–121.
- Dihingia, A., Kalita, J., and Manna, P. (2017). Implication of a novel Gla-containing protein, Gas6 in the pathogenesis of insulin resistance, impaired glucose homeostasis, and inflammation: A review. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *128*, 74–82.
- Diwan, V., Mistry, A., Gobe, G., and Brown, L. (2013). Adenine-induced chronic kidney and cardiovascular damage in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* *68*, 197–207.
- Dosanjh, A., and Kebebew, E. (2005). Calciphylaxis: rare but fatal. *Curr. Surg.* *62*, 455–458.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., et al. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* *382*, 448–452.
- Ebino, K.Y. (1993). Studies on coprophagy in experimental animals. *Jikken Dobutsu* *42*, 1–9.
- Edson, K.Z., Prasad, B., Unadkat, J.D., Suhara, Y., Okano, T., Guengerich, F.P., and Rettie, A.E. (2013). Cytochrome P450-dependent catabolism of vitamin K: ω -hydroxylation catalyzed by human CYP4F2 and CYP4F11. *Biochemistry (Mosc.)* *52*, 8276–8285.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Turck, D., Bresson, J., Burlingame, B., Dean, T., Fairweather-Tait, S., Heinonen, M., Hirsch-Ernst, K.I., Mangelsdorf, I., McArdle, H.J., et al. (2017). Dietary reference values for vitamin K. *EFSA J.* *15*.
- Eitzinger, N., Surmann-Schmitt, C., Bösl, M., Schett, G., Engelke, K., Hess, A., von der Mark, K., and Stock, M. (2012). Ucma is not necessary for normal development of the mouse skeleton. *Bone* *50*, 670–680.
- Farley, S.M., Leonard, S.W., Labut, E.M., Raines, H.F., Card, D.J., Harrington, D.J., Mustacich, D.J., and Traber, M.G. (2012). Vitamin E decreases extra-hepatic menaquinone-4 concentrations in rats fed menadione or phylloquinone. *Mol. Nutr. Food Res.* *56*, 912–922.

- Farley, S.M., Leonard, S.W., Taylor, A.W., Birringer, M., Edson, K.Z., Rettie, A.E., and Traber, M.G. (2013). ω -Hydroxylation of phylloquinone by CYP4F2 is not increased by α -tocopherol. *Mol. Nutr. Food Res.* *57*, 1785–1793.
- Fasco, M.J., Preusch, P.C., Hildebrandt, E., and Suttie, J.W. (1983). Formation of hydroxyvitamin K by vitamin K epoxide reductase of warfarin-resistant rats. *J. Biol. Chem.* *258*, 4372–4380.
- Ferland, G., and Sadowski, J.A. (1992). Vitamin K1 (phylloquinone) content of edible oils: effects of heating and light exposure. *J. Agric. Food Chem.* *40*, 1869–1873.
- Fernandez, F., and Collins, M.D. (1987). Vitamin K composition of anaerobic gut bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* *41*, 175–180.
- Ferron, M., Hinoi, E., Karsenty, G., and Ducy, P. (2008). Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5266–5270.
- Fredericks, W.J., Yin, H., Lal, P., Puthiyaveettil, R., Malkowicz, S.B., Fredericks, N.J., Tomaszewski, J., Rauscher, F.J., and Malkowicz, S.B. (2013). Ectopic expression of the TERE1 (UBIAD1) protein inhibits growth of renal clear cell carcinoma cells: altered metabolic phenotype associated with reactive oxygen species, nitric oxide and SXR target genes involved in cholesterol and lipid metabolism. *Int. J. Oncol.* *43*, 638–652.
- Freeman, R.V., and Otto, C.M. (2005). Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* *111*, 3316–3326.
- Frick, P.G., Riedler, G., and Brögli, H. (1967). Dose response and minimal daily requirement for vitamin K in man. *J. Appl. Physiol.* *23*, 387–389.
- Fu, X., Booth, S.L., and Smith, D.E. (2007). Vitamin K contents of rodent diets: a review. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* *46*, 8–12.
- Fuery, M.A., Liang, L., Kaplan, F.S., and Mohler, E.R. (2017). Vascular ossification: Pathology, mechanisms, and clinical implications. *Bone*.
- Garber, A.K., Binkley, N.C., Krueger, D.C., and Suttie, J.W. (1999). Comparison of Phylloquinone Bioavailability from Food Sources or a Supplement in Human Subjects. *J. Nutr.* *129*, 1201–1203.
- Gijsbers, B.L., Jie, K.S., and Vermeer, C. (1996). Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers. *Br. J. Nutr.* *76*, 223–229.
- Girardot, J.M. (1982). Vitamin K-dependent carboxylase. Partial purification and properties of the enzyme-substrate complex. *J. Biol. Chem.* *257*, 15008–15011.
- Goncalves, A., Margier, M., Roi, S., Collet, X., Niot, I., Goupy, P., Caris-Veyrat, C., and Reboul, E. (2014). Intestinal Scavenger Receptors Are Involved in Vitamin K1 Absorption. *J. Biol. Chem.* *289*, 30743–30752.
- Goodstadt, L., and Ponting, C.P. (2004). Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem. Sci.* *29*, 289–292.
- Griminger, P. (1967). Biological Activity of the Various Vitamin K Forms. *Vitam. Horm.* *24*, 605–618.

- H. Trad, C., and Butterfield, D.A. (1994). Menadione-induced cytotoxicity effects on human erythrocyte membranes studied by electron paramagnetic resonance. *Toxicol. Lett.* **73**, 145–155.
- Hammed, A., Matagrín, B., Spohn, G., Prouillac, C., Benoit, E., and Lattard, V. (2013). VKORC1L1, an enzyme rescuing the vitamin K 2,3-epoxide reductase activity in some extrahepatic tissues during anticoagulation therapy. *J. Biol. Chem.* **288**, 28733–28742.
- Harrington, D.J., Soper, R., Edwards, C., Savidge, G.F., Hodges, S.J., and Shearer, M.J. (2005). Determination of the urinary aglycone metabolites of vitamin K by HPLC with redox-mode electrochemical detection. *J. Lipid Res.* **46**, 1053–1060.
- Harrington, D.J., Booth, S.L., Card, D.J., and Shearer, M.J. (2007). Excretion of the urinary 5C- and 7C-aglycone metabolites of vitamin K by young adults responds to changes in dietary phylloquinone and dihydrophylloquinone intakes. *J. Nutr.* **137**, 1763–1768.
- Hauschka, P.V., Lian, J.B., and Gallop, P.M. (1975). Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 3925–3929.
- Hegarty, J.M., Yang, H., and Chi, N.C. (2013). UBIAD1-mediated vitamin K2 synthesis is required for vascular endothelial cell survival and development. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 1713–1719.
- Hinoi, E., Gao, N., Jung, D.Y., Yadav, V., Yoshizawa, T., Myers, M.G., Chua, S.C., Kim, J.K., Kaestner, K.H., and Karsenty, G. (2008). The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J. Cell Biol.* **183**, 1235–1242.
- Hirota, Y., Tsugawa, N., Nakagawa, K., Suhara, Y., Tanaka, K., Uchino, Y., Takeuchi, A., Sawada, N., Kamao, M., Wada, A., et al. (2013a). Menadione (vitamin K3) is a catabolic product of oral phylloquinone (vitamin K1) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K2) in rats. *J. Biol. Chem.* **288**, 33071–33080.
- Hirota, Y., Tsugawa, N., Nakagawa, K., Suhara, Y., Tanaka, K., Uchino, Y., Takeuchi, A., Sawada, N., Kamao, M., Wada, A., et al. (2013b). Menadione (vitamin K3) is a catabolic product of oral phylloquinone (vitamin K1) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K2) in rats. *J. Biol. Chem.* **288**, 33071–33080.
- Hirota, Y., Nakagawa, K., Sawada, N., Okuda, N., Suhara, Y., Uchino, Y., Kimoto, T., Funahashi, N., Kamao, M., Tsugawa, N., et al. (2015). Functional characterization of the vitamin K2 biosynthetic enzyme UBIAD1. *PLoS One* **10**, e0125737.
- Hirsh, J., Fuster, V., Ansell, J., Halperin, J.L., and American Heart Association/American College of Cardiology Foundation (2003). American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 1633–1652.
- Hodges, S.J., Pilkington, M.J., Shearer, M.J., Bitensky, L., and Chayen, J. (1990). Age-related changes in the circulating levels of congeners of vitamin K2, menaquinone-7 and menaquinone-8. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **1979** **78**, 63–66.
- Hörnberg, A., Eneqvist, T., Olofsson, A., Lundgren, E., and Sauer-Eriksson, A.E. (2000). A comparative analysis of 23 structures of the amyloidogenic protein transthyretin. *J. Mol. Biol.* **302**, 649–669.
- Hortells, L., Sosa, C., Guillén, N., Lucea, S., Millán, Á., and Sorribas, V. (2017). Identifying early pathogenic events during vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int.*

- Howe, A.M., and Webster, W.S. (2000). Warfarin exposure and calcification of the arterial system in the rat. *Int. J. Exp. Pathol.* *81*, 51–56.
- Hsiao, F.-C., Lin, Y.-F., Hsieh, P.-S., Chu, N.-F., Shieh, Y.-S., Hsieh, C.-H., Lee, C.-H., and Hung, Y.-J. (2013). Circulating growth arrest-specific 6 protein is associated with adiposity, systemic inflammation, and insulin resistance among overweight and obese adolescents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, E267-274.
- Hubbard, B.R., Ulrich, M.M., Jacobs, M., Vermeer, C., Walsh, C., Furie, B., and Furie, B.C. (1989). Vitamin K-dependent carboxylase: affinity purification from bovine liver by using a synthetic propeptide containing the gamma-carboxylation recognition site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 6893–6897.
- Huber, A.M., Davidson, K.W., O'Brien-Morse, M.E., and Sadowski, J.A. (1999). Gender differences in hepatic phylloquinone and menaquinones in the vitamin K-deficient and -supplemented rat. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1426*, 43–52.
- Hung, Y.-J., Lee, C.-H., Chu, N.-F., and Shieh, Y.-S. (2010). Plasma protein growth arrest-specific 6 levels are associated with altered glucose tolerance, inflammation, and endothelial dysfunction. *Diabetes Care* *33*, 1840–1844.
- Ito, A., Shirakawa, H., Takumi, N., Minegishi, Y., Ohashi, A., Howlader, Z.H., Ohsaki, Y., Sato, T., Goto, T., and Komai, M. (2011). Menaquinone-4 enhances testosterone production in rats and testis-derived tumor cells. *Lipids Health Dis.* *10*, 158.
- Jacob, J., Endepols, S., Pelz, H.-J., Kampling, E., Cooper, T.G., Yeung, C.H., Redmann, K., and Schlatt, S. (2012). Vitamin K requirement and reproduction in bromadiolone-resistant Norway rats. *Pest Manag. Sci.* *68*, 378–385.
- Jaffe, I.Z., Tintut, Y., Newfell, B.G., Demer, L.L., and Mendelsohn, M.E. (2007). Mineralocorticoid receptor activation promotes vascular cell calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *27*, 799–805.
- Jiang, X., Tao, H., Qiu, C., Ma, X., Li, S., Guo, X., Lv, A., and Li, H. (2016). Vitamin K2 regression aortic calcification induced by warfarin via Gas6/Axl survival pathway in rats. *Eur. J. Pharmacol.* *786*, 10–18.
- Johnson, R.C., Leopold, J.A., and Loscalzo, J. (2006). Vascular Calcification: Pathobiological Mechanisms and Clinical Implications. *Circ. Res.* *99*, 1044–1059.
- Kaipatur, N.R., Murshed, M., and McKee, M.D. (2008). Matrix Gla protein inhibition of tooth mineralization. *J. Dent. Res.* *87*, 839–844.
- Kamao, M., Sahara, Y., Tsugawa, N., Uwano, M., Yamaguchi, N., Uenishi, K., Ishida, H., Sasaki, S., and Okano, T. (2007). Vitamin K Content of Foods and Dietary Vitamin K Intake in Japanese Young Women. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* *53*, 464–470.
- Kelly-Arnold, A., Maldonado, N., Laudier, D., Aikawa, E., Cardoso, L., and Weinbaum, S. (2013). Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 10741–10746.
- Ketteler, M., Bongartz, P., Westenfeld, R., Wildberger, J.E., Mahnken, A.H., Böhm, R., Metzger, T., Wanner, C., Jahnke-Dechent, W., and Floege, J. (2003). Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet Lond. Engl.* *361*, 827–833.

- Kohn, M.H., Price, R.E., and Pelz, H.-J. (2008). A cardiovascular phenotype in warfarin-resistant *Vkorc1* mutant rats. *Artery Res.* 2, 138–147.
- Koivu-Tikkanen, T.J., Schurgers, L.J., Thijssen, H.H., and Vermeer, C. (2000). Intestinal, hepatic, and circulating vitamin K levels at low and high intakes of vitamin K in rats. *Br. J. Nutr.* 83, 185–190.
- Komai, M., Shirakawa, H., and Kimura, S. (1988). Newly developed model for vitamin K deficiency in germfree mice. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Vitam.-Ernährungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.* 58, 55–59.
- Konishi, T., and Bara, S. (1973). Intracellular and intramitochondrial distribution of vitamin K: biochemical and electron microscopic radioautographic study. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 21, 2479–2487.
- Krossøy, C., Lock, E.-J., and Ørnsrud, R. (2010). Vitamin K-dependent gamma-glutamylcarboxylase in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 36, 627–635.
- Krüger, T., Oelenberg, S., Kaesler, N., Schurgers, L.J., van de Sandt, A.M., Boor, P., Schlieper, G., Brandenburg, V.M., Fekete, B.C., Veulemans, V., et al. (2013). Warfarin induces cardiovascular damage in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2618–2624.
- Kudo, A. (2017). Introductory review: periostin-gene and protein structure. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.*
- Lamon-Fava, S., Sadowski, J.A., Davidson, K.W., O'Brien, M.E., McNamara, J.R., and Schaefer, E.J. (1998). Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K1) in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1226–1231.
- Lau, W.L., Liu, S., and Vaziri, N.D. (2014). Chronic kidney disease results in deficiency of ABCC6, the novel inhibitor of vascular calcification. *Am. J. Nephrol.* 40, 51–55.
- Laurance, S., Lemarié, C.A., and Blostein, M.D. (2012). Growth arrest-specific gene 6 (*gas6*) and vascular hemostasis. *Adv. Nutr. Bethesda Md* 3, 196–203.
- Lee, C.-H., Chu, N.-F., Shieh, Y.-S., and Hung, Y.-J. (2012). The growth arrest-specific 6 (*Gas6*) gene polymorphism c.834+7G>A is associated with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 95, 201–206.
- Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., et al. (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130, 456–469.
- Leening, M.J.G., Elias-Smale, S.E., Kavousi, M., Felix, J.F., Deckers, J.W., Vliegenthart, R., Oudkerk, M., Hofman, A., Steyerberg, E.W., Stricker, B.H.C., et al. (2012). Coronary Calcification and the Risk of Heart Failure in the Elderly: The Rotterdam Study. *JACC Cardiovasc. Imaging* 5, 874–880.
- Li, J., Lin, J.C., Wang, H., Peterson, J.W., Furie, B.C., Furie, B., Booth, S.L., Volpe, J.J., and Rosenberg, P.A. (2003). Novel role of vitamin K in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 5816–5826.
- Li, T., Chang, C.-Y., Jin, D.-Y., Lin, P.-J., Khvorova, A., and Stafford, D.W. (2004). Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427, 541–544.
- Li, W., Schulman, S., Dutton, R.J., Boyd, D., Beckwith, J., and Rapoport, T.A. (2010). Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. *Nature* 463, 507–512.

- Lieberman, M., Johnson, R.C., Handy, D.E., Loscalzo, J., and Leopold, J.A. (2011). Bone morphogenetic protein-2 activates NADPH oxidase to increase endoplasmic reticulum stress and human coronary artery smooth muscle cell calcification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *413*, 436–441.
- Liu, M., Park, J., Wu, X., Li, Y., Tran, Q., Mun, K., Lee, Y., Hur, G.M., Wen, A., and Park, J. (2015). Shen-Kang protects 5/6 nephrectomized rats against renal injury by reducing oxidative stress through the MAPK signaling pathways. *Int. J. Mol. Med.* *36*, 975–984.
- Luo, G., Ducey, P., McKee, M.D., Pinero, G.J., Loyer, E., Behringer, R.R., and Karsenty, G. (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* *386*, 78–81.
- Maccorquodale, D.W., Cheney, L.C., Binkley, S.B., Holcomb, W.F., McKEE, R.W., Thayer, S.A., and Doisy, E.A. (1939). The constitution and synthesis of vitamin K1. *J. Biol. Chem.* *131*, 357–370.
- Makarović, S., Makarović, Z., Steiner, R., Mihaljević, I., and Milas-Ahić, J. (2015). Osteoprotegerin and Vascular Calcification: Clinical and Prognostic Relevance. *Coll. Antropol.* *39*, 461–468.
- Malashkevich, V.N., Almo, S.C., and Dowd, T.L. (2013). X-ray crystal structure of bovine 3 Glu-osteocalcin. *Biochemistry (Mosc.)* *52*, 8387–8392.
- Malyankar, U.M., Scatena, M., Suchland, K.L., Yun, T.J., Clark, E.A., and Giachelli, C.M. (2000). Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *275*, 20959–20962.
- Mameesh, M.S., and Johnson, B.C. (1959). Production of dietary vit. K deficiency in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* *101*, 467–468.
- Manoury, E., Jourdon, K., Boyaval, P., and Fourcassié, P. (2013). Quantitative measurement of vitamin K2 (menaquinones) in various fermented dairy products using a reliable high-performance liquid chromatography method. *J. Dairy Sci.* *96*, 1335–1346.
- Matagrín, B., Hodroge, A., Montagut-Romans, A., Andru, J., Fourel, I., Besse, S., Benoit, E., and Lattard, V. (2013). New insights into the catalytic mechanism of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) - The catalytic properties of the major mutations of rVKORC1 explain the biological cost associated to mutations. *FEBS Open Bio* *3*, 144–150.
- McCann, J.C., and Ames, B.N. (2009). Vitamin K, an example of triage theory: is micronutrient inadequacy linked to diseases of aging? *Am J Clin Nutr* *90*, 889–907.
- McCullough, P.A., Agrawal, V., Danielewicz, E., and Abela, G.S. (2008). Accelerated Atherosclerotic Calcification and Mönckeberg's Sclerosis: A Continuum of Advanced Vascular Pathology in Chronic Kidney Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* *3*, 1585–1598.
- McDonald, M.G., Rieder, M.J., Nakano, M., Hsia, C.K., and Rettie, A.E. (2009). CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: An explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant. *Mol. Pharmacol.* *75*, 1337–1346.
- McDowell, L.R. (2012). *Vitamins in Animal Nutrition: Comparative Aspects to Human Nutrition* (Elsevier).

McGarvey, T.W., Nguyen, T., Tomaszewski, J.E., Monson, F.C., and Malkowicz, S.B. (2001). Isolation and characterization of the TERE1 gene, a gene down-regulated in transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncogene* 20, 1042–1051.

McGarvey, T.W., Nguyen, T., Puthiyaveettil, R., Tomaszewski, J.E., and Malkowicz, S.B. (2003). TERE1, a novel gene affecting growth regulation in prostate carcinoma. *The Prostate* 54, 144–155.

McGarvey, T.W., Nguyen, T.B., and Malkowicz, S.B. (2005). An interaction between apolipoprotein E and TERE1 with a possible association with bladder tumor formation. *J. Cell. Biochem.* 95, 419–428.

McKee, R.W., Binkley, S.B., Thayer, S.A., MacCORQUODALE, D.W., and Doisy, E.A. (1939). The isolation of vitamin K2. *J. Biol. Chem.* 131, 327–344.

McRobb, L., Handelsman, D.J., and Heather, A.K. (2009). Androgen-induced progression of arterial calcification in apolipoprotein E-null mice is uncoupled from plaque growth and lipid levels. *Endocrinology* 150, 841–848.

Mellette, S.J., and Leone, L.A. (1960). Influence of age, sex, strain of rat and fat soluble vitamins on hemorrhagic syndromes in rats fed irradiated beef. *Fed. Proc.* 19, 1045–1049.

Metta, V.C., and Johnson, B.C. (1960). Effect of feeding vitamin K-deficient diets to female rats. *J. Nutr.* 72, 455–458.

Metta, V.A., Mameesh, M.S., and Johnson, B.C. (1959). Vitamin K deficiency in rats induced by the feeding of irradiated beef. *J. Nutr.* 69, 18–22.

de Metz, M., Vermeer, C., Soute, B.A., van Scharrenburg, G.J., Slotboom, A.J., and Hemker, H.C. (1981). Partial purification of bovine liver vitamin K-dependent carboxylase by immunospecific adsorption onto antifactor X. *FEBS Lett.* 123, 215–218.

Mi, Y., Xiao, X., Liu, D., Ping, N., Zhu, Y., Li, B., Long, L., and Cao, Y. (2016). Establishing a rat model for the study of vitamin K deficiency. *Int. J. Exp. Pathol.* 97, 187–193.

Nakagawa, K., Hirota, Y., Sawada, N., Yuge, N., Watanabe, M., Uchino, Y., Okuda, N., Shimomura, Y., Suhara, Y., and Okano, T. (2010). Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature* 468, 117–121.

Nakagawa, K., Sawada, N., Hirota, Y., Uchino, Y., Suhara, Y., Hasegawa, T., Amizuka, N., Okamoto, T., Tsugawa, N., Kamao, M., et al. (2014). Vitamin K2 biosynthetic enzyme, UBIAD1 is essential for embryonic development of mice. *PloS One* 9, e104078.

Naylor, H.M., and Newcomer, M.E. (1999). The structure of human retinol-binding protein (RBP) with its carrier protein transthyretin reveals an interaction with the carboxy terminus of RBP. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 2647–2653.

Nelson, R.G., Gohdes, D.M., Everhart, J.E., Hartner, J.A., Zwemer, F.L., Pettitt, D.J., and Knowler, W.C. (1988). Lower-extremity amputations in NIDDM. 12-yr follow-up study in Pima Indians. *Diabetes Care* 11, 8–16.

Neves, K.R., Gracioli, F.G., dos Reis, L.M., Gracioli, R.G., Neves, C.L., Magalhães, A.O., Custódio, M.R., Batista, D.G., Jorgetti, V., and Moysés, R.M.A. (2007). Vascular calcification: contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney Int.* 71, 1262–1270.

- Nguy, L., Shubbar, E., Jernås, M., Nookaew, I., Lundgren, J., Olsson, B., Nilsson, H., and Guron, G. (2016). Adenine-induced chronic renal failure in rats decreases aortic relaxation rate and alters expression of proteins involved in vascular smooth muscle calcium handling. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 218, 250–264.
- Nickerson, M.L., Bosley, A.D., Weiss, J.S., Kostiha, B.N., Hirota, Y., Brandt, W., Esposito, D., Kinoshita, S., Wessjohann, L., Morham, S.G., et al. (2013). The UBIAD1 prenyltransferase links menaquinone-4 [corrected] synthesis to cholesterol metabolic enzymes. *Hum. Mutat.* 34, 317–329.
- Nitschke, Y., and Rutsch, F. (2012). Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum: two sides of the same coin. *Front. Genet.* 3, 302.
- Novelli, E.L.B., Diniz, Y.S., Galhardi, C.M., Ebaid, G.M.X., Rodrigues, H.G., Mani, F., Fernandes, A. a. H., Cicogna, A.C., and Novelli Filho, J.L.V.B. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab. Anim.* 41, 111–119.
- O'Brien, K.D. (2006). Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1721–1728.
- Ohta, A., Baba, S., Ohtsuki, M., Taguchi, A., and Adachi, T. (1996). Prevention of coprophagy modifies magnesium absorption in rats fed with fructo-oligosaccharides. *Br. J. Nutr.* 75, 775–784.
- Oldenburg, J., Watzka, M., and Bevans, C.G. (2015). VKORC1 and VKORC1L1: Why do Vertebrates Have Two Vitamin K 2,3-Epoxy Reductases? *Nutrients* 7, 6250–6280.
- Olson, R.E., Chao, J., Graham, D., Bates, M.W., and Lewis, J.H. (2002). Total body phylloquinone and its turnover in human subjects at two levels of vitamin K intake. *Br. J. Nutr.* 87, 543–553.
- Orr, A., Dubé, M.-P., Marcadier, J., Jiang, H., Federico, A., George, S., Seamone, C., Andrews, D., Dubord, P., Holland, S., et al. (2007). Mutations in the UBIAD1 gene, encoding a potential prenyltransferase, are causal for Schnyder crystalline corneal dystrophy. *PloS One* 2, e685.
- Osako, M.K., Nakagami, H., Koibuchi, N., Shimizu, H., Nakagami, F., Koriyama, H., Shimamura, M., Miyake, T., Rakugi, H., and Morishita, R. (2010). Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. *Circ. Res.* 107, 466–475.
- Otsuka, M., Kato, N., Shao, R.-X., Hoshida, Y., Ijichi, H., Koike, Y., Taniguchi, H., Moriyama, M., Shiratori, Y., Kawabe, T., et al. (2004). Vitamin K2 inhibits the growth and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells via protein kinase A activation. *Hepatology* 40, 243–251.
- Otto, C.M., and Prendergast, B. (2014). Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction. *N. Engl. J. Med.* 371, 744–756.
- Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C.E., Hermo, L., Suarez, S., Roth, B.L., Ducy, P., et al. (2011). Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 144, 796–809.
- Pediatrics, A.A.O., and Nutrition, C.O. (1961). Vitamin K compounds and the water-soluble analogues. Use in therapy and prophylaxis in pediatrics. *Pediatrics* 28, 501–507.
- Pelz, H.-J., Rost, S., Hünerberg, M., Fregin, A., Heiberg, A.-C., Baert, K., MacNicoll, A.D., Prescott, C.V., Walker, A.-S., Oldenburg, J., et al. (2005). The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* 170, 1839–1847.

- Preusch, P.C., and Suttie, J.W. (1984). Formation of 3-Hydroxy-2,3-dihydrovitamin K1 In Vivo: Relationship to Vitamin K Epoxide Reductase and Warfarin Resistance. *J. Nutr.* *114*, 902–910.
- Price, P.A., Williamson, M.K., Haba, T., Dell, R.B., and Jee, W.S. (1982). Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 7734–7738.
- Price, P.A., Urist, M.R., and Otawara, Y. (1983). Matrix Gla protein, a new γ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *117*, 765–771.
- Price, P.A., Faus, S.A., and Williamson, M.K. (1998). Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *18*, 1400–1407.
- Price, P.A., Faus, S.A., and Williamson, M.K. (2000). Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *20*, 317–327.
- Proudfoot, D., and Shanahan, C.M. (2006). Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrol. Carlton Vic* *11*, 455–461.
- Proudfoot, D., Skepper, J.N., Hegyi, L., Bennett, M.R., Shanahan, C.M., and Weissberg, P.L. (2000). Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ. Res.* *87*, 1055–1062.
- Qiao, J.-H., Mertens, R.B., Fishbein, M.C., and Geller, S.A. (2003). Cartilaginous metaplasia in calcified diabetic peripheral vascular disease: morphologic evidence of enchondral ossification. *Hum. Pathol.* *34*, 402–407.
- Reboul, E., and Borel, P. (2011). Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes. *Prog. Lipid Res.* *50*, 388–402.
- Rennenberg, R.J.M.W., Kessels, A.G.H., Schurgers, L.J., van Engelshoven, J.M.A., de Leeuw, P.W., and Kroon, A.A. (2009). Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis. *Vasc. Health Risk Manag.* *5*, 185–197.
- Rifkin, D.E., Ix, J.H., Wassel, C.L., Criqui, M.H., and Allison, M.A. (2012). Renal Artery Calcification and Mortality Among Clinically Asymptomatic Adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* *60*, 1079–1085.
- Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hörtnagel, K., Pelz, H.-J., Lappegard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E.G., et al. (2004a). Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* *427*, 537–541.
- Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hörtnagel, K., Pelz, H.-J., Lappegard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E.G.D., et al. (2004b). Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* *427*, 537–541.
- Rost, S., Fregin, A., Hünerberg, M., Bevans, C.G., Müller, C.R., and Oldenburg, J. (2005). Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb. Haemost.* *94*, 780–786.

- Rost, S., Pelz, H.-J., Menzel, S., MacNicoll, A.D., Leon, V., Song, K.-J., Jaekel, T., Oldenburg, J., and Muller, C.R. (2009). Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice - a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genet.* *10*, 4.
- Rzewuska-Lech, E., Jayachandran, M., Fitzpatrick, L.A., and Miller, V.M. (2005). Differential effects of 17beta-estradiol and raloxifene on VSMC phenotype and expression of osteoblast-associated proteins. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *289*, E105-112.
- Sage, A.P., Tintut, Y., and Demer, L.L. (2010). Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat. Rev. Cardiol.* *7*, 528–536.
- Sato, T., Ozaki, R., Kamo, S., Hara, Y., Konishi, S., Isobe, Y., Saitoh, S., and Harada, H. (2003). The biological activity and tissue distribution of 2',3'-dihydrophyloquinone in rats. *Biochim. Biophys. Acta* *1622*, 145–150.
- Schafer, C., Heiss, A., Schwarz, A., Westenfeld, R., Ketteler, M., Floege, J., Muller-Esterl, W., Schinke, T., and Jahnke-Dechent, W. (2003). The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J. Clin. Invest.* *112*, 357–366.
- Schneider, C., King, R.M., and Philipson, L. (1988). Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* *54*, 787–793.
- Schurgers, L.J., and Vermeer, C. (2000). Determination of phyloquinone and menaquinones in food. Effect of food matrix on circulating vitamin K concentrations. *Haemostasis* *30*, 298–307.
- Schurgers, L.J., and Vermeer, C. (2002). Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. *Biochim. Biophys. Acta* *1570*, 27–32.
- Schurgers, L.J., Geleijnse, J.M., Grobbee, D.E., Pols, H.A.P., Hofman, A., Witteman, J.C.M., and Vermeer, C. (1999). Nutritional Intake of Vitamins K1 (Phylloquinone) and K2 (Menaquinone) in The Netherlands. *J. Nutr. Environ. Med.* *9*, 115–122.
- Schurgers, L.J., Spronk, H.M.H., Soute, B.A.M., Schiffers, P.M., DeMey, J.G.R., and Vermeer, C. (2007a). Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood* *109*, 2823–2831.
- Schurgers, L.J., Spronk, H.M.H., Soute, B.A.M., Schiffers, P.M., DeMey, J.G.R., and Vermeer, C. (2007b). Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood* *109*, 2823–2831.
- Sebastian, E.M., Suva, L.J., and Friedman, P.A. (2008). Differential effects of intermittent PTH(1-34) and PTH(7-34) on bone microarchitecture and aortic calcification in experimental renal failure. *Bone* *43*, 1022–1030.
- Shearer, M.J., and Newman, P. (2008). Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb. Haemost.* *100*, 530–547.
- Shearer, M.J., McBurney, A., and Barkhan, P. (1974). Studies on the absorption and metabolism of phyloquinone (vitamin K1) in man. *Vitam. Horm.* *32*, 513–542.
- Shirakawa, H., Ohsaki, Y., Minegishi, Y., Takumi, N., Ohinata, K., Furukawa, Y., Mizutani, T., and Komai, M. (2006). Vitamin K deficiency reduces testosterone production in the testis through down-regulation

of the Cyp11a a cholesterol side chain cleavage enzyme in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 1482–1488.

Silverman, R. (1981). Chemical-model studies for the mechanism of vitamin-K epoxide reductase. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 5939–5941.

Son, B.-K., Akishita, M., Iijima, K., Ogawa, S., Maemura, K., Yu, J., Takeyama, K., Kato, S., Eto, M., and Ouchi, Y. (2010). Androgen receptor-dependent transactivation of growth arrest-specific gene 6 mediates inhibitory effects of testosterone on vascular calcification. *J. Biol. Chem.* 285, 7537–7544.

Suhara, Y., Wada, A., Tachibana, Y., Watanabe, M., Nakamura, K., Nakagawa, K., and Okano, T. (2010). Structure-activity relationships in the conversion of vitamin K analogues into menaquinone-4. Substrates essential to the synthesis of menaquinone-4 in cultured human cell lines. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 3116–3124.

Suhara, Y., Hanada, N., Okitsu, T., Sakai, M., Watanabe, M., Nakagawa, K., Wada, A., Takeda, K., Takahashi, K., Tokiwa, H., et al. (2012). Structure-activity relationship of novel menaquinone-4 analogues: modification of the side chain affects their biological activities. *J. Med. Chem.* 55, 1553–1558.

Sunnerhagen, M., Drakenberg, T., Forsen, S., and Stenflo, J. (1996). Effect of Ca²⁺ on the structure of vitamin K-dependent coagulation factors. *Haemostasis* 26 Suppl 1, 45–53.

Surmann-Schmitt, C., Dietz, U., Kireva, T., Adam, N., Park, J., Tagariello, A., Önnarfjord, P., Heinegård, D., Schlötzer-Schrehardt, U., Deutzmann, R., et al. (2008). Ucm, a Novel Secreted Cartilage-specific Protein with Implications in Osteogenesis. *J. Biol. Chem.* 283, 7082–7093.

Tabb, M.M., Sun, A., Zhou, C., Grün, F., Errandi, J., Romero, K., Pham, H., Inoue, S., Mallick, S., Lin, M., et al. (2003). Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J. Biol. Chem.* 278, 43919–43927.

Takeo, S., Tanonaka, R., Tanonaka, K., Miyake, K., Hisayama, H., Ueda, N., Kawakami, K., Tsumura, H., Katsushika, S., and Taniguchi, Y. (1991). Alterations in cardiac function and subcellular membrane activities after hypervitaminosis D3. *Mol. Cell. Biochem.* 107, 169–183.

Thane, C.W., Paul, A.A., Bates, C.J., Bolton-Smith, C., Prentice, A., and Shearer, M.J. (2002). Intake and sources of phylloquinone (vitamin K1): variation with socio-demographic and lifestyle factors in a national sample of British elderly people. *Br. J. Nutr.* 87, 605–613.

Thijssen, H.H., and Drittij-Reijnders, M.J. (1996). Vitamin K status in human tissues: tissue-specific accumulation of phylloquinone and menaquinone-4. *Br. J. Nutr.* 75, 121–127.

Thijssen, H.H.W., and Drittij-Reijnders, M.J. (1994). Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4. *Br. J. Nutr.* 72, 415–425.

Thijssen, H.H., Drittij-Reijnders, M.J., and Fischer, M.A. (1996). Phylloquinone and menaquinone-4 distribution in rats: synthesis rather than uptake determines menaquinone-4 organ concentrations. *J. Nutr.* 126, 537–543.

Thompson, B., and Towler, D.A. (2012). Arterial calcification and bone physiology: role of the bone-vascular axis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 529–543.

- Thor, H., Smith, M.T., Hartzell, P., Bellomo, G., Jewell, S.A., and Orrenius, S. (1982). The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. *J. Biol. Chem.* *257*, 12419–12425.
- Tie, J.-K., and Stafford, D.W. (2016). Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *J. Thromb. Haemost. JTH* *14*, 236–247.
- Tie, J., Wu, S.M., Jin, D., Nicchitta, C.V., and Stafford, D.W. (2000). A topological study of the human gamma-glutamyl carboxylase. *Blood* *96*, 973–978.
- Tie, J.-K., Nicchitta, C., von Heijne, G., and Stafford, D.W. (2005). Membrane topology mapping of vitamin K epoxide reductase by in vitro translation/cotranslocation. *J. Biol. Chem.* *280*, 16410–16416.
- Tran, H.A., Chunilal, S.D., and Tran, H. (2014). An update of consensus guidelines for warfarin reversal. *Med. J. Aust.* *200*, 82.
- Trumbo, P., Yates, A.A., Schlicker, S., and Poos, M. (2001). Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J. Am. Diet. Assoc.* *101*, 294–301.
- Uchida, K., Nomura, Y., Takase, H., Harauchi, T., Yoshizaki, T., and Nakao, H. (1986). Effects of vitamin K-deficient diets and fasting on blood coagulation factors in conventional and germ-free rats. *Jpn. J. Pharmacol.* *40*, 115–122.
- Usui, Y., Tanimura, H., Nishimura, N., Kobayashi, N., Okanou, T., and Ozawa, K. (1990). Vitamin K concentrations in the plasma and liver of surgical patients. *Am. J. Clin. Nutr.* *51*, 846–852.
- Vermeer, C., Hendrix, H., and Daemen, M. (1982). Vitamin K-dependent carboxylases from non-hepatic tissues. *FEBS Lett.* *148*, 317–320.
- Vermeer, C., van 't Hoofd, C., Knapen, M.H.J., and Xanthoulea, S. (2017). Synthesis of 2-methyl-1,4-naphthoquinones with higher gamma-glutamyl carboxylase activity than MK-4 both in vitro and in vivo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *27*, 208–211.
- Viegas, C.S.B., Simes, D.C., Laizé, V., Williamson, M.K., Price, P.A., and Cancela, M.L. (2008). Gla-rich protein (GRP), a new vitamin K-dependent protein identified from sturgeon cartilage and highly conserved in vertebrates. *J. Biol. Chem.* *283*, 36655–36664.
- Viegas, C.S.B., Cavaco, S., Neves, P.L., Ferreira, A., João, A., Williamson, M.K., Price, P.A., Cancela, M.L., and Simes, D.C. (2009). Gla-Rich Protein Is a Novel Vitamin K-Dependent Protein Present in Serum That Accumulates at Sites of Pathological Calcifications. *Am. J. Pathol.* *175*, 2288–2298.
- Viegas, C.S.B., Costa, R.M., Santos, L., Videira, P.A., Silva, Z., Araújo, N., Macedo, A.L., Matos, A.P., Vermeer, C., and Simes, D.C. (2017). Gla-rich protein function as an anti-inflammatory agent in monocytes/macrophages: Implications for calcification-related chronic inflammatory diseases. *PLoS One* *12*, e0177829.
- Villa-Belostta, R., Rivera-Torres, J., Osorio, F.G., Acín-Pérez, R., Enriquez, J.A., López-Otín, C., and Andrés, V. (2013). Defective extracellular pyrophosphate metabolism promotes vascular calcification in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome that is ameliorated on pyrophosphate treatment. *Circulation* *127*, 2442–2451.

- Watzka, M., Geisen, C., Bevans, C.G., Sittinger, K., Spohn, G., Rost, S., Seifried, E., Müller, C.R., and Oldenburg, J. (2011). Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: insights into improved patient diagnosis and treatment. *J. Thromb. Haemost. JTH* 9, 109–118.
- Westhofen, P., Watzka, M., Marinova, M., Hass, M., Kirfel, G., Müller, J., Bevans, C.G., Müller, C.R., and Oldenburg, J. (2011). Human vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) mediates vitamin K-dependent intracellular antioxidant function. *J. Biol. Chem.* 286, 15085–15094.
- Will, B.H., Usui, Y., and Suttie, J.W. (1992). Comparative metabolism and requirement of vitamin K in chicks and rats. *J. Nutr.* 122, 2354–2360.
- Wu, M., Rementer, C., and Giachelli, C.M. (2013). Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif. Tissue Int.* 93, 365–373.
- Wu, S.M., Morris, D.P., and Stafford, D.W. (1991a). Identification and purification to near homogeneity of the vitamin K-dependent carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2236–2240.
- Wu, S.M., Cheung, W.F., Frazier, D., and Stafford, D.W. (1991b). Cloning and expression of the cDNA for human gamma-glutamyl carboxylase. *Science* 254, 1634–1636.
- Yamanashi, Y., Takada, T., Kurauchi, R., Tanaka, Y., Komine, T., and Suzuki, H. (2017). Transporters for the Intestinal Absorption of Cholesterol, Vitamin E, and Vitamin K. *J. Atheroscler. Thromb.* 24, 347–359.
- Yen, C.S., and Mack, D.O. (1980). Solubilized rat liver vitamin K carboxylase demonstrates little selectivity between vitamin K1 and the menaquinones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 165, 306–308.
- Yokozawa, T., Zheng, P.D., Oura, H., and Koizumi, F. (1986). Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* 44, 230–234.
- Zebboudj, A.F., Shin, V., and Boström, K. (2003). Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J. Cell. Biochem.* 90, 756–765.
- Zhu, A., Sun, H., Raymond, R.M., Furie, B.C., Furie, B., Bronstein, M., Kaufman, R.J., Westrick, R., and Ginsburg, D. (2007). Fatal hemorrhage in mice lacking gamma-glutamyl carboxylase. *Blood* 109, 5270–5275.