



**HAL**  
open science

# Identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le rétrécissement aortique

Bérénice Colleville

► **To cite this version:**

Bérénice Colleville. Identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le rétrécissement aortique. Sciences agricoles. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR084 . tel-02457544

**HAL Id: tel-02457544**

**<https://theses.hal.science/tel-02457544>**

Submitted on 28 Jan 2020

**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.



Normandie Université

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé**

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

### **Identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le rétrécissement aortique**

**Présentée et soutenue par  
Bérénice COLLEVILLE**

**Thèse soutenue publiquement le 09 Décembre 2019 à 10h, dans la salle des thèses du bâtiment Stewart,  
devant le jury composé de**

Mme. le Pr. Giuseppina CALIGIURI	DR / Université Paris Diderot	Rapporteur
Mme. le Dr. Isabelle SIX	MCF / Université de Picardie Jules Verne	Rapporteur
M. le Pr. Alain MANRIQUE	PU-PH / Université de Caen Normandie	Examineur
M. le Pr. Jean-Philippe COLLET	PU-PH / Université Paris Sorbonne	Examineur
M. le Pr. Vincent RICHARD	PU-PH / Université de Rouen Normandie	Directeur du laboratoire
M. le Pr. Éric DURAND	PU-PH / Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par le Pr. Éric DURAND, laboratoire INSERM U1096  
Endothélium, Valvulopathies et Insuffisance Cardiaque**











# *Remerciements*



# Table des matières

<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>i</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>v</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>CHAPITRE I - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>1</b>
<b>I- LA VALVE AORTIQUE</b> .....	<b>4</b>
1. Anatomie générale du cœur.....	4
a. Morphologie du cœur .....	4
b. Les valves cardiaques .....	4
2. Anatomie de la valve aortique et de la racine de l'aorte .....	5
a. Anatomie descriptive.....	5
i. La valve aortique.....	5
ii. La racine de l'aorte .....	5
b. Anatomie fonctionnelle .....	6
c. Environnement hémodynamique.....	7
3. Physiologie de la valve aortique.....	8
a. Développement de la valve aortique .....	8
b. Structure histologique des feuillets valvulaires aortiques .....	9
i. La fibrosa .....	9
ii. La spongiosa .....	9
iii. La ventricularis .....	9
c. Les composants cellulaires .....	10
i. Les cellules endothéliales valvulaires (VECs).....	10
ii. Les cellules interstitielles valvulaires (VICs) .....	11
Les VICs progénitrices (pVICs).....	11
◇ Les VICs quiescentes (qVICs) .....	12
◇ Les VICs actives (aVICs).....	12
◇ Les VICs ostéoblastiques (obVICs) .....	13
<b>II- LE RÉTRÉCISSEMENT AORTIQUE CALCIFIÉ</b> .....	<b>14</b>
1. Généralités.....	14
2. Épidémiologie .....	14
3. Étiologie .....	15
a. Le RAC d'origine dégénérative.....	15
b. Malformation congénitale de la valve : la bicuspidie valvulaire aortique .....	15
c. Le RAC d'origine rhumatismale .....	16
4. Facteurs de risques et prédisposition génétique .....	16
a. Facteurs de risques .....	16
b. Prédisposition génétique .....	16
5. Diagnostic du RAC .....	16
a. Symptomatologie clinique.....	16

i.	L'angor.....	17
ii.	La dyspnée .....	17
iii.	La syncope et la lipothymie .....	17
b.	Signes échocardiographiques .....	17
i.	Surface valvulaire aortique .....	18
ii.	Le jet de vélocité (AoVmax).....	18
iii.	Le gradient de pression transaortique .....	19
iv.	Autres signes mesurés par écho-doppler.....	19
6.	Prise en charge du RAC .....	19
a.	Les essais thérapeutiques.....	19
i.	Les statines .....	20
ii.	Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE-I).....	20
b.	Traitement chirurgical .....	20
i.	Le remplacement valvulaire aortique.....	20
ii.	Le TAVI.....	21
7.	Physiopathologie du RAC.....	21
a.	Généralités .....	22
b.	Similarité entre RAC et athérosclérose .....	22
c.	Phase d'initiation du RAC.....	23
i.	Lésions de l'endothélium .....	23
ii.	Dépôts lipidiques dans la valve aortique.....	25
◇	LDL oxydés.....	26
◇	Lipoprotéine(a).....	27
iii.	Pénétration des cellules circulantes inflammatoires .....	27
iv.	Production de radicaux libres.....	28
v.	Néo-angiogenèse .....	29
d.	Phase de progression du RAC.....	29
i.	Remodelage fibrotique .....	29
◇	La fibrose.....	30
◇	La protéolyse .....	30
ii.	Différenciation ostéoblastique .....	30
◇	BMP-2 .....	30
◇	Wnt/ $\beta$ -caténine .....	31
◇	Notch .....	31
◇	Angiotensine II.....	32
◇	Le récepteur sensible au calcium (CaSR).....	32
8.	L'endothéline-1 .....	32
a.	Généralités .....	33
b.	Synthèse de l'endothéline-1 .....	33
c.	Les récepteurs à l'endothéline-1 .....	33
d.	Le système endothélinergique en conditions physiopathologiques .....	34
i.	En conditions physiologiques .....	34
ii.	En conditions pathologiques .....	35
e.	Le système endothélinergique dans les calcifications vasculaires et valvulaires.....	36
f.	Inhibition du système endothélinergique .....	36
<b>III-</b>	<b>LES MODÈLES ANIMAUX EXPÉRIMENTAUX.....</b>	<b>38</b>
1.	Le porc.....	38
2.	Le lapin.....	38
3.	La souris .....	40

a. Modèles dyslipidémiques .....	40
b. Régimes alimentaires hypercholestérolémiants et hyperglycémiantes .....	41
c. Les autres modèles génétiquement modifiés .....	41
d. Lésions mécaniques de la valve .....	42
4. Le modèle <i>Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup></i> .....	43
<b>OBJECTIFS DE LA THÈSE .....</b>	<b>44</b>
<b>CHAPITRE II - MATÉRIELS &amp; MÉTHODES .....</b>	<b>46</b>
<b>I- MODÈLES EXPÉRIMENTAUX ET TECHNIQUES DE GÉNOTYPAGE .....</b>	<b>48</b>
1. Animaux utilisés.....	48
a. Expérimentation animale.....	48
b. Souris sauvages .....	48
c. Souris génétiquement modifiées pour le récepteur à l'EGFR .....	48
2. Génotypage des animaux .....	48
a. Biopsie des tissus.....	48
b. Extraction de l'ADN génomique.....	49
c. Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	49
d. Migration et révélation .....	50
<b>II- SUPPLÉMENTATION EN VITAMINE D<sub>3</sub> ET RÉGIME HYPERCHOLESTÉROLÉMIANT .....</b>	<b>51</b>
1. Optimisation chez les souris C57BL6/J .....	51
a. Choix de la dose optimale de vitamine D <sub>3</sub> et de la voie d'administration .....	51
b. Régime hypercholestérolémiant .....	51
2. Étude chez les souris <i>Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup></i> .....	52
<b>III- ÉVALUATION DE LA FONCTION CARDIAQUE ET VALVULAIRE .....</b>	<b>52</b>
1. Échocardiographe.....	52
2. Préparation des animaux .....	52
3. Fonction cardiaque .....	53
a. Temps-Mouvement.....	53
b. Analyse doppler.....	53
4. Fonction valvulaire aortique.....	54
a. Temps-Mouvement.....	54
b. Analyse doppler.....	54
<b>IV- DOSAGES BIOCHIMIQUES.....</b>	<b>54</b>
1. Prélèvement du sérum sanguin.....	54
2. Dosage sérique .....	54
<b>V- HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHEMIE .....</b>	<b>55</b>
1. Prélèvement du cœur et méthode de coupe de la valve aortique .....	55
2. Histologie .....	55
a. Coloration au rouge Sirius.....	55
b. Coloration au rouge alizarine .....	55
c. Quantification de la fibrose et des calcifications valvulaires .....	55
3. Immunohistochimie.....	56
a. Immunomarquages .....	56
b. Quantification de la densité capillaire, de l'inflammation et de la calcification.....	57



<b>VI- CULTURE CELLULAIRE .....</b>	<b>57</b>
1. Prélèvements humains et éthique .....	57
2. Isolation des cellules valvulaires aortiques .....	57
a. Isolation des cellules endothéliales .....	58
b. Isolation des cellules interstitielles.....	58
3. Milieu de culture pro-calcifiant.....	58
4. Co-culture.....	59
<b>VII- IMMUNOCYTOCHIMIE .....</b>	<b>59</b>
<b>VIII- BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....</b>	<b>60</b>
1. RT-qPCR semi-quantitative en temps réel.....	60
a. Extraction des ARNs totaux .....	60
b. Traitement à la DNase I .....	61
c. Réaction de transcription inverse .....	61
d. PCR quantitative .....	62
2. Western Blot.....	63
a. Méthode d'extraction des protéines.....	63
b. Mesure de l'expression protéique .....	64
3. Mesure du calcium : méthode de dosage o-crésolphthaléine.....	64
<b>IX- ANALYSES STATISTIQUES .....</b>	<b>65</b>
<b>CHAPITRE III - RESULTATS &amp; DISCUSSIONS.....</b>	<b>66</b>
<b>Étude 1.....</b>	<b>68</b>
<b>Étude 2.....</b>	<b>78</b>
Résultats de l'étude 2 .....	78
◇ Caractérisation des cellules endothéliales et interstitielles valvulaires humaines.....	78
◇ Optimisation du milieu pro-calcifiant .....	79
◇ Quantification du calcium dans les hVICs issues de valves contrôles et sténosées.....	80
◇ Expression des gènes liés à l'endothéline dans les hVECs dans les valves contrôles et sténosées.....	81
◇ Expression des gènes liés à l'endothéline et de la calcification dans les hVICs dans les valves contrôles et sténosées .....	82
◇ Effet de l'endothéline-1 sur la calcification .....	83
◇ Courbe dose-réponse à l'endothéline-1 .....	83
◇ Quantification du calcium dans les hVICs incubées avec de l'ET-1 .....	83
◇ Expression des gènes liés à l'endothéline et de la calcification et les hVICs incubées avec ou sans ET-1.....	84
◇ Analyse protéique de la calcification dans les hVICs .....	85
Discussion de l'étude 2 .....	86
<b>CHAPITRE IV - CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>90</b>
<b>VALORISATION SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>94</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>96</b>

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Anatomie générale du cœur .....	4
<b>Figure 2</b> : Situation anatomique des valves cardiaques .....	5
<b>Figure 3</b> : Structure de la racine aortique .....	6
<b>Figure 4</b> : Anatomie de la racine aortique.....	6
<b>Figure 5</b> : Représentation des différentes forces mécaniques subies par la valve aortique .....	7
<b>Figure 6</b> : Développement de la valve aortique .....	8
<b>Figure 7</b> : Remodelage de la valve aortique.....	9
<b>Figure 8</b> : Structure d'un feuillet valvulaire aortique.....	10
<b>Figure 9</b> : Origine et phénotype des cellules interstitielles valvulaires.....	11
<b>Figure 10</b> : Déterminants de l'activation des VICs lors de lésions valvulaires .....	13
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique d'une valve aortique saine et sténosée .....	14
<b>Figure 12</b> : Représentation schématique d'une valve aortique bicuspidée.....	15
<b>Figure 13</b> : Survie après apparition des symptômes chez les patients opérés et non opérés...	17
<b>Figure 14</b> : Classification de la sévérité de la sténose aortique valvulaire.....	18
<b>Figure 15</b> : Représentation de l'équation de continuité pour le calcul de la surface valvulaire aortique.....	18
<b>Figure 16</b> : Différents types de prothèses valvulaires aortiques .....	21
<b>Figure 17</b> : Représentation d'un remplacement valvulaire aortique par voie percutanée .....	21
<b>Figure 18</b> : Représentation d'une coupe d'un feuillet valvulaire aortique.....	22
<b>Figure 19</b> : Réponses biologiques au flux sanguin en conditions normales ou pathologiques sur le versant aortique du feuillet valvulaire .....	24
<b>Figure 20</b> : Microfissuration de l'endothélium promouvant la calcification des feuillets valvulaires aortiques.....	25
<b>Figure 21</b> : Implication des lipides et de leurs dérivés dans le RAC .....	26
<b>Figure 22</b> : Représentation schématique de la structure de la lipoprotéine(a) .....	27
<b>Figure 23</b> : Processus pathologiques de la sténose aortique .....	28
<b>Figure 24</b> : Voies de signalisation impliquées dans la différenciation des VICs.....	31
<b>Figure 25</b> : Synthèse et régulation de l'endothéline.....	33
<b>Figure 26</b> : Effets de l'endothéline-1 dans le système cardiovasculaire.....	35
<b>Figure 27</b> : Valve aortique sténosée chez le lapin NZWR .....	39
<b>Figure 28</b> : Modèle de lésion mécanique de la valve aortique .....	42

<b><u>Figure 29</u></b> : Le modèle de souris $Egfr^{Wa2/Wa2}$ .....	43
<b><u>Figure 30</u></b> : Représentation schématique des différentes coupes échocardiographiques.....	53
<b><u>Figure 31</u></b> : Représentation schématique d'une co-culture en système Transwell .....	59
<b><u>Figure 32</u></b> : Caractérisation du phénotype des hVECs et des hVICs.....	79
<b><u>Figure 33</u></b> : Choix et optimisation du milieu pro-calcifiant.....	80
<b><u>Figure 34</u></b> : Quantification de la concentration en calcium dans les hVICs .....	80
<b><u>Figure 35</u></b> : Niveau d'expression génique de l'endothéline-1 et des gènes associés dans les hVECs .....	81
<b><u>Figure 36</u></b> : Niveau d'expression des gènes liés à l'endothéline et de la calcification dans les hVICs .....	82
<b><u>Figure 37</u></b> : Courbe dose-réponse à l'endothéline-1 .....	83
<b><u>Figure 38</u></b> : Quantification de la concentration en calcium dans les hVICs incubées avec de l'ET-1 .....	84
<b><u>Figure 39</u></b> : Niveau d'expression des gènes liés à l'endothéline et de la calcification dans les hVICs incubées avec ou sans endothéline-1 .....	85
<b><u>Figure 40</u></b> : Activité protéique de l'ostéopontine et de la phosphatase alcaline .....	85

## *Liste des tableaux*

<b><u>Tableau 1</u></b> : Comparaison du RAC et de l'athérosclérose. ....	23
<b><u>Tableau 2</u></b> : Séquences d'amorces PCR pour le géotypage .....	50
<b><u>Tableau 3</u></b> : Condition de programmation des PCR pour le géotypage.....	50
<b><u>Tableau 4</u></b> : Mise au point de la dose d'injection en vitamine D <sub>3</sub> , de la voie d'administration et du régime hypercholestérolémiant .....	51
<b><u>Tableau 5</u></b> : Anticorps primaires utilisés pour la réalisation de l'immunohistochimie .....	56
<b><u>Tableau 6</u></b> : Anticorps secondaires utilisés pour la réalisation de l'immunohistochimie.....	57
<b><u>Tableau 7</u></b> : Anticorps primaires utilisés pour la réalisation de l'immunocytochimie .....	60
<b><u>Tableau 8</u></b> : Anticorps secondaires utilisés pour la réalisation de l'immunocytochimie.....	60
<b><u>Tableau 9</u></b> : Condition de programmation de la PCR quantitative .....	62
<b><u>Tableau 10</u></b> : Séquences sens et anti-sens des amorces humaines utilisées pour la qPCR.....	63
<b><u>Tableau 11</u></b> : Anticorps primaires utilisés pour la réalisation du western blot.....	64



## *Liste des abréviations*

<b>1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub></b>	Vitamine D <sub>3</sub>
<b>αSMA</b>	Alpha-smooth muscle cell
<b>ACE-I</b>	Angiotensin-converting enzyme inhibitor
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ALP</b>	Alcaline phosphatase
<b>AMPc</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>AoGmoy</b>	Gradient de pression transvalvulaire aortique moyen
<b>AoVmax</b>	Vitesse maximale transvalvulaire aortique
<b>ApoE</b>	Apolipoprotéine E
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATX</b>	Autotaxine
<b>BMP-2</b>	Bone morphogenic protein 2
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>BA</b>	Bicuspidie aortique
<b>CaSR</b>	Récepteur sensible au calcium
<b>CE</b>	Cellule endothéliale
<b>CML</b>	Cellule musculaire lisse
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>ECE</b>	Enzyme de conversion de l'endothéline
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>ERK1/2</b>	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
<b>ERO</b>	Espèce réactive de l'oxygène
<b>ET-1</b>	Endothéline-1
<b>ET<sub>A</sub>-R</b>	Récepteur à l'endothéline de type A
<b>ET<sub>B</sub>-R</b>	Récepteur à l'endothéline de type B
<b>FEVG</b>	Fraction d'éjection du VG
<b>FGF-2</b>	Fibroblast growth factor 2
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane

<b>HEY</b>	Hairy repressor
<b>HF/HC</b>	High-fat/high-carbohydrate
<b>HFD</b>	High fat diet
<b>IA</b>	Insuffisance aortique
<b>ICAM-1</b>	Intercellular adhesion molecule 1
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol(1,4,5)triphosphate
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinases
<b>LDL</b>	Low density lipoprotein
<b>Lp-PLA<sub>2</sub></b>	Lipoprotéine associée à la phospholipase A <sub>2</sub>
<b>Lp(a)</b>	Lipoprotéine(a)
<b>LPA</b>	Acide lysophosphatidylque
<b>LPAR1</b>	Récepteur de type 1 à l'acide lysophosphatidylque
<b>LPC</b>	Lysophosphatidylcholine
<b>LPR</b>	Low-density lipoprotein receptor-related protein
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinases
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemoattractant protein 1
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MMP</b>	Métalloprotéinase
<b>Msx2</b>	Msh homeobox 2
<b>Mttp</b>	Microsomal triglyceride transfer protein
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>NICD</b>	Notch intracellular domain
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>NOS</b>	Nitric oxide synthase
<b>NZWR</b>	New Zealand white rabbit
<b>oxLDL</b>	Lipoprotéine de basse densité oxydée
<b>oxPL</b>	Phospholipide oxydé
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction

<b>PECAM-1</b>	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
<b>PFA</b>	Paraformaldéhyde
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate
<b>PKA</b>	Protéine kinase A
<b>PLA2</b>	Phospholipase A2
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>RAC</b>	Rétrécissement aortique calcifié
<b>RANK</b>	Receptor-activator of NF- $\kappa$ B
<b>RBPjk</b>	Recombining binding protein suppressor of the hairy family of repressors
<b>RhoA</b>	Ras homolog family member A
<b>ROCK</b>	Rho-associated protein kinase
<b>Runx2</b>	Runt-related transcription factor 2
<b>RVA</b>	Remplacement valvulaire aortique
<b>SVF</b>	Sérum de veau fœtal
<b>TAVI</b>	Transcatheter aortic valve implantation
<b>TBS-T</b>	Tris-Buffered Saline Tween 20
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor $\beta$
<b>TEM</b>	Transition endothélio-mésenchymateuse
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor $\alpha$
<b>TNFR1/2</b>	Tumor necrosis factor receptor 1/2
<b>VCAM-1</b>	Vascular cell adhesion molecule 1
<b>VEC</b>	Valvular endothelial cell
<b>VG</b>	Ventricule gauche
<b>VIC</b>	Valvular interstitial cell
<b>vW</b>	Von Willebrand
<b>WT</b>	Wild type





## Résumé

Le rétrécissement aortique calcifié (RAC) est la valvulopathie la plus fréquente dans les pays occidentaux et touche environ 2% des sujets de plus de 65 ans. Initialement considérée comme une dégénérescence passive de la valve aortique liée à l'âge, le RAC est actuellement considéré comme une pathologie complexe et hautement régulée et qui aboutit à un épaissement et à une calcification des feuillets valvulaires aortiques. À ce jour les mécanismes initiateurs et favorisant la progression du RAC ne sont pas complètement élucidés, et d'autre part, aucun traitement ne s'est avéré efficace pour ralentir ou stopper son évolution. Le remplacement valvulaire aortique (chirurgical ou percutané) reste le seul traitement en cas de rétrécissement aortique serré. D'autre part, il n'existe aucun modèle animal fiable et reproductible du RAC permettant de mieux comprendre la physiopathologie de cette valvulopathie et de tester de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans le laboratoire, nous avons fait l'hypothèse que la dysfonction de l'endothélium valvulaire jouait un rôle important dans l'initiation et la progression du RAC, et nous souhaitons utiliser un modèle animal permettant d'évaluer l'effet de nouvelles thérapeutiques. Ce travail porte donc sur l'évaluation du rôle du système endothélinergique dans la sténose aortique calcifiée et le développement d'un nouveau modèle animal murin de RAC.

Dans notre première étude, nous nous sommes intéressés au modèle de souris *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>*. Ce modèle est induit par la substitution du résidu aminé glycine par une valine. Les souris *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* homozygotes pour la mutation voient leur activité tyrosine kinase diminuée de 90%. Ce modèle induit un épaissement fibreux des feuillets valvulaires avec peu de calcifications. Cependant, l'augmentation du flux transaortique n'est pas liée à un RAC mais à une insuffisance aortique (IA). Nous avons évalué dans ce modèle l'effet d'un régime enrichi en graisse et d'une supplémentation en vitamine D<sub>3</sub>. Malgré une augmentation des taux sériques du cholestérol, de la vitamine D<sub>3</sub> et de la calcémie, nous n'avons pas observé d'augmentation de la calcification. Le modèle *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* reste essentiellement un modèle d'IA avec le développement d'un RAC qui reste rare ou absent.

Dans notre seconde étude, nous avons évalué le rôle du système endothélinergique dans des cultures primaires de cellules valvulaires interstitielles (hVICs) et endothéliales (hVECs) humaines, prélevées lors d'un remplacement valvulaire aortique chirurgical chez des patients

ayant un RAC serré. Les valves de patients traités par une intervention de Bentall ont été utilisées comme groupe contrôle. Nous avons tout d'abord observé, par RT-PCR quantitative, que les hVECs issues de valves sténosées présentaient une augmentation non significative de l'ARNm codant pour l'endothéline et une augmentation significative de l'ARNm codant pour le récepteur ET-B, ainsi qu'une diminution significative de l'enzyme de conversion de l'endothéline dans les hVECs par rapport aux hVECs issues de valves contrôles. Le récepteur ET-B était également surexprimé dans les hVICs par rapport aux valves contrôles. En revanche, nous n'avons pas retrouvé de variation d'expression du récepteur ET-A dans les hVICs. Nous avons ensuite évalué l'effet de l'endothéline-1 (ET-1) dans les hVICs. Nous avons retrouvé que les hVICs calcifient lorsqu'elles sont en présence d'ET-1.

Ces données suggèrent une implication du système endothélinergique dans la calcification valvulaire aortique. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre son implication, notamment en évaluant l'effet d'antagoniste des récepteurs de l'endothéline dans des cultures de hVICs puis dans un modèle animal fiable mimant cette pathologie.

**Mots clés** : rétrécissement aortique, modèle expérimental, culture cellulaire, endothéline-1

# *Abstract*

Aortic stenosis (AS) is the most common valvulopathy in Western countries and affects approximately 2% of subjects over 65 years of age. Originally considered a passive age-related degeneration of the aortic valve, AS is currently considered a complex and highly regulated pathology that results in thickening and calcification of aortic valve leaflets. To date the mechanisms initiating and promoting the progression of AS are not completely understood and secondly, no treatment has been effective to slow or stop its evolution. Aortic valve replacement (surgical or percutaneous) remains the only treatment for severe aortic stenosis. On the other hand, there is no reliable and reproducible animal model of AS to better understand the pathophysiology of this valvulopathy and to test new therapeutic targets. In the laboratory, we hypothesized that valvular endothelial dysfunction plays an important role in the initiation and progression of AS and we wish to use an animal model to evaluate the effect of new therapeutics. This work focuses on assessing the role of the endothelinergic system in AS and the development of a novel mouse animal model of AS.

First, we used the *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* mouse model. This model is induced by the substitution of the amino glycine residue by a valine. The *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* mice homozygous for the mutation have their tyrosine kinase activity decreased by 90%. This model induces fibrous thickening of the leaflets with little calcification, but the increase in transaortic flow is not related to AS but to aortic regurgitation (AR). In this model we evaluated the effect of a fat-enriched diet and vitamin D<sub>3</sub> supplementation. Despite increased serum levels of cholesterol, vitamin D<sub>3</sub> and serum calcium, we did not observe an increase in calcification. The *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* model remains essentially a model of AR whereas AS remains rare or absent.

Second, we evaluated the role of the endothelinergic system in primary cultures of human interstitial valvular (hVICs) and endothelial (hVECs) cells, obtained from AS patients treated by surgical aortic valve replacement. The valves of patients treated by a Bentall procedure were used as a control group. We first observed, by quantitative RT-PCR, that stenotic valves showed an increase in mRNA encoding endothelin and for its ET-B receptor and a decrease in the endothelin converting enzyme in the hVECs compared to the control valves. The ET-B receptor was also overexpressed in the hVICs compared to the control valves. We did not find any variation in expression of its ET-A receptor in hVICs. We then assessed the effect of endothelin-1 (ET-1) in the hVICs. We found that hVICs calcify when they are in the presence of ET-1.

These data suggest involvement of the endothelinergic system in aortic valve calcification. Further studies are needed to better understand its involvement, notably by evaluating the effect of endothelin receptor antagonist in hVICs cultures and then in a reliable animal model mimicking this pathology

**Keywords:** aortic stenosis, experimental model, cell culture, endothelin-1

Chapitre I  
*Revue bibliographique*

---

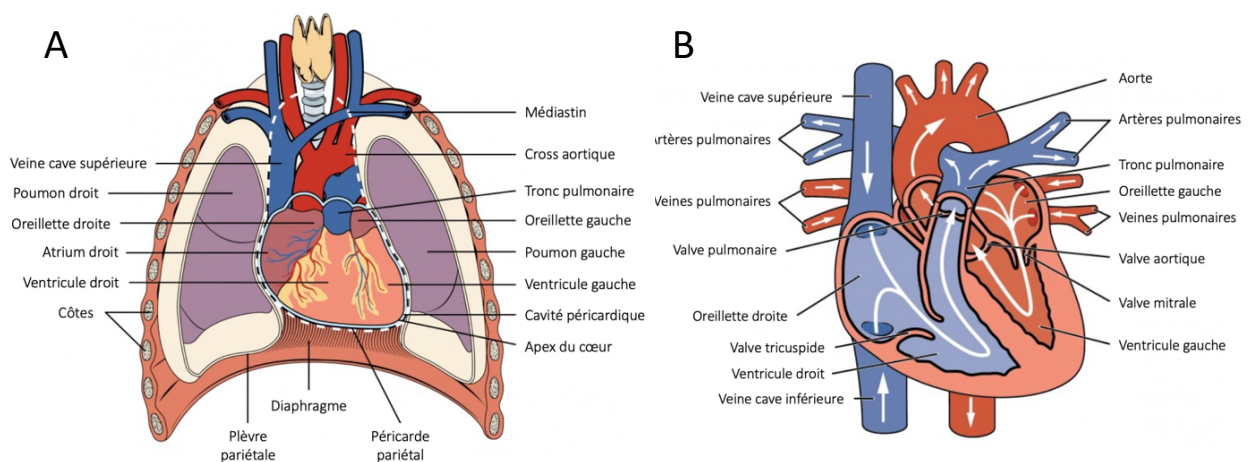


## I- LA VALVE AORTIQUE

### 1. Anatomie générale du cœur

#### a. Morphologie du cœur

Le cœur est un organe contractile qui permet de faire circuler le sang dans les vaisseaux. Il se situe au milieu du thorax, délimité par les deux poumons. Cette partie du thorax est appelée le médiastin (figure 1A). Le cœur comprend quatre cavités. Les cavités cardiaques droites et gauches sont totalement séparées par le septum. Les cavités droites, formées par l'oreillette et le ventricule droit, recueillent le sang non oxygéné *via* les veines caves (supérieure et inférieure) pour l'envoyer dans la circulation pulmonaire (ou petite circulation) *via* les artères pulmonaires afin de réoxygéner le sang et éliminer le dioxyde de carbone en excès. Les cavités gauches, formées par l'oreillette et le ventricule gauche, récupèrent le sang oxygéné *via* les veines pulmonaires pour l'envoyer dans la circulation systémique (ou grande circulation) *via* l'aorte (figure 1B).



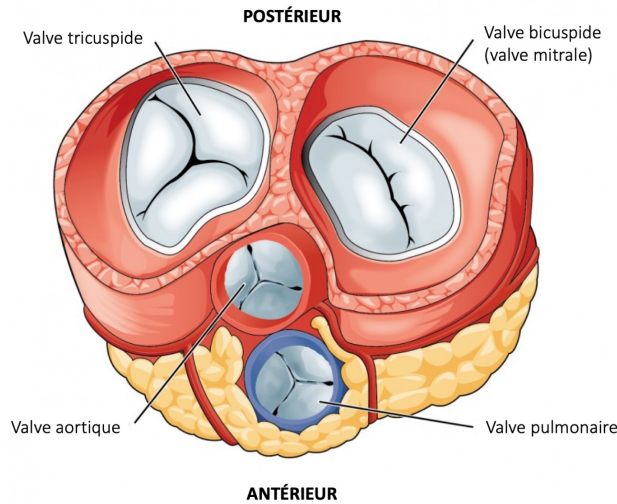
**Figure 1 : Anatomie générale du cœur,** (A) situation du cœur dans le thorax, (B) coupe longitudinale cardiaque. (d'après le site Lumen Learning [en ligne] <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/heart-anatomy/>)

#### b. Les valves cardiaques

Les valves cardiaques sont des structures dynamiques et structurées qui sont indispensables à la circulation unidirectionnelle du sang. Au cours de la vie, elles vont s'ouvrir et se fermer environ cent mille fois par jour<sup>1</sup>. Les valves sont au nombre de quatre. Les valves situées entre les oreillettes et les ventricules sont les valves auriculo-ventriculaires droite et gauche, aussi appelées respectivement valve tricuspide et valve mitrale. Elles empêchent le reflux sanguin des ventricules vers les oreillettes lors de la systole. Les valves localisées entre les ventricules



et les grandes artères, sont appelées valves semi-lunaires. La valve pulmonaire et la valve aortique sont situées respectivement à la base du tronc pulmonaire et à la base de l'aorte. Elles empêchent quant à elles le reflux sanguin des artères vers les ventricules lors de la diastole (figure 2).



**Figure 2** : Situation anatomique des valves cardiaques, en vue transversale ; les artères et les oreillettes ont été enlevées. (d'après le site Lumen Learning [en ligne] <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/heart-anatomy/>)

## 2. Anatomie de la valve aortique et de la racine de l'aorte

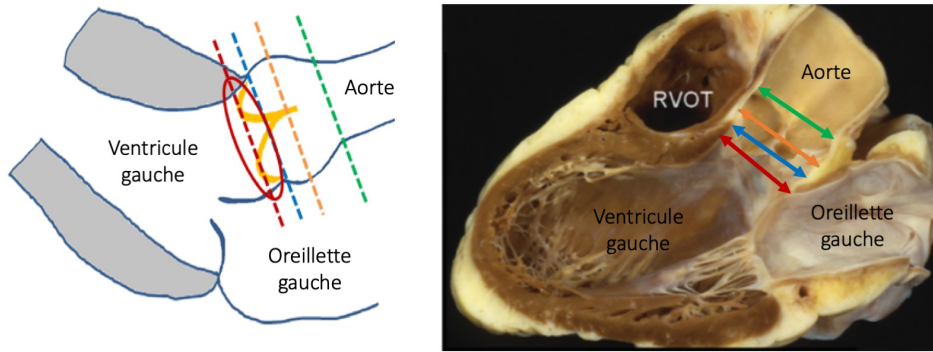
### a. Anatomie descriptive

#### i. La valve aortique

La valve aortique se situe entre le ventricule gauche et l'aorte. Elle sert de jonction hémodynamique permettant le passage du sang du ventricule gauche dans l'aorte lors de la systole, et empêchant la régurgitation du sang lors de la diastole. La valve aortique est constituée de trois cuspidés (ou sigmoïdes aortiques) de forme semi-lunaire, dont la base est attachée à la paroi aortique. Lorsque la valve est fermée, les bords libres des sigmoïdes adjacentes se touchent et constituent les commissures. Au centre de chaque bord libre se trouve un renflement fibreux, appelé nodule d'Arantius, qui participe à la coaptation valvulaire<sup>2</sup>.

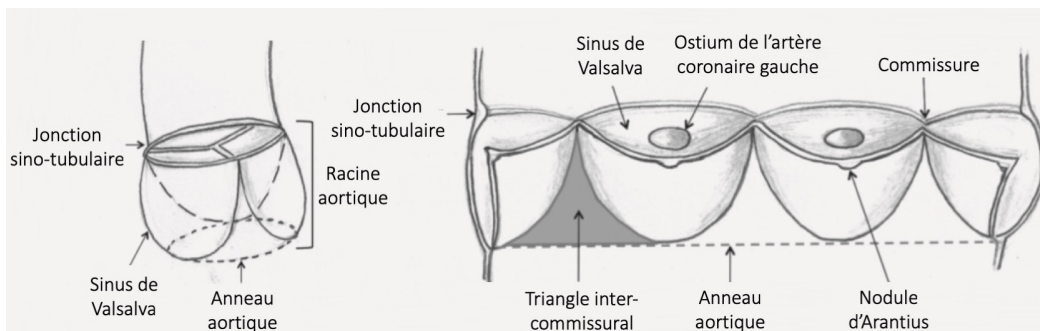
#### ii. La racine de l'aorte

La valve aortique est une structure complexe qui s'intègre dans une unité fonctionnelle appelée racine aortique. La racine aortique correspond à la portion située entre le ventricule gauche et l'aorte ascendante et sert de structure de soutien à la valve aortique. La racine aortique comprend l'anneau aortique, les triangles inter-commissuraux, les sinus de Valsalva et la jonction sino-tubulaire<sup>3</sup> (figure 3).



**Figure 3 : Structure de la racine aortique**, coupe longitudinale du cœur. Anneau aortique (rouge), triangles inter-commissuraux (bleu), sinus de Valsalva (orange), jonction sino-tubulaire (vert) ; RVOT, right ventricular outflow tract. (adapté de S. Y. Ho et coll., *Eur. J. of Echocardiography*, 2009)

L'implantation des cuspides sur la paroi aortique constitue un anneau fibreux, l'anneau aortique, qui sert de soutien au complexe valvulaire. Entre l'anneau aortique et les commissures se trouvent les triangles inter-commissuraux. D'un point de vue fonctionnel, ils sont un prolongement de la voie d'éjection du ventricule gauche<sup>4</sup>. En regard de chaque cuspidé, les sinus de Valsalva correspondent aux parties dilatées de la paroi aortique. On distingue trois sinus de Valsalva en fonction de l'origine des artères coronaires. Ils sont ainsi nommés : sinus coronaires droit et gauche, donnant respectivement naissance aux artères coronaires droite et gauche ; et le sinus non-coronarien<sup>2,4</sup>. Enfin, la jonction sino-tubulaire est constituée de la partie distale des sinus de Valsalva et des commissures et sépare la racine aortique de l'aorte ascendante<sup>2</sup> (figure 4).



**Figure 4 : Anatomie de la racine aortique**, représentation schématisée de l'insertion des sigmoïdes sur la paroi aortique. (d'après K. Hanneman et coll., *radioGraphics*, 2016<sup>2</sup>)

### b. Anatomie fonctionnelle

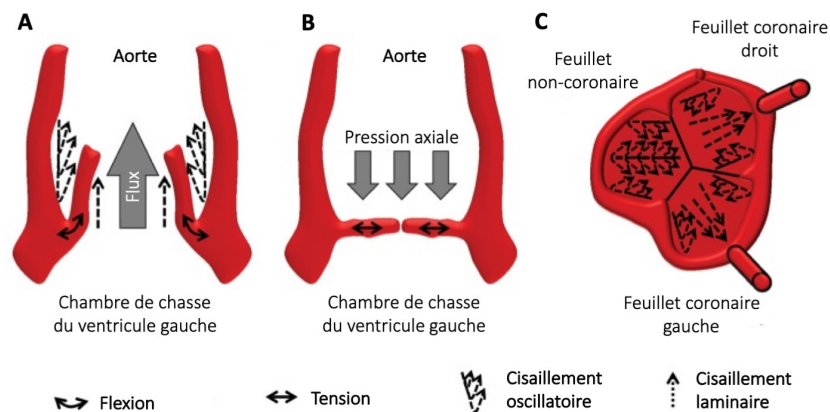
La surface d'ouverture normale de la valve aortique est de 3 à 4 cm<sup>2</sup> en systole. Elle s'ouvre en systole lorsque la pression du ventricule gauche est supérieure à la pression aortique, et se ferme en diastole en raison de la diminution de différence de pression axiale et sous l'action du reflux sanguin dans les sinus de Valsalva, empêchant ainsi la régurgitation du sang dans le ventricule

gauche (figure 5). Cette cinétique valvulaire n'est pas qu'un simple mécanisme passif. En effet, en début de systole, l'ouverture de la valve aortique est favorisée par un déplacement de l'anneau aortique vers la chambre de chasse du ventricule gauche, entraînant une augmentation des diamètres de la racine aortique à la partie ascendante de l'aorte. En fin de systole et en début de diastole, le reflux sanguin crée des tourbillons entre les sinus de Valsalva et les sigmoïdes, initiant ainsi la fermeture de la valve. La fermeture de la valve est complète lorsque la pression aortique est supérieure à la pression du ventricule gauche<sup>5</sup>.

### c. Environnement hémodynamique

Au cours du cycle cardiaque, la valve aortique subit des forces mécaniques qui apparaissent simultanément ou consécutivement. C'est pour s'adapter et supporter ces différentes forces que la valve aortique présente une anatomie qui lui est propre (cf. partie I.3.b.).

Lors du cycle d'ouverture et de fermeture de la valve, les feuillets sont soumis à des forces de tension et de flexion (figure 5A et B). En systole, les feuillets aortiques sont soumis à des forces de cisaillement laminaire du côté ventriculaire lors du passage du sang, et à des forces de cisaillement oscillatoires du côté aortique lors du reflux sanguin<sup>6</sup> (figure 5A et B). Ces forces de cisaillement, aussi appelées *shear stress*, soumettent l'endothélium de la valve aortique aux frottements répétés des éléments figurés du sang. Ces forces de cisaillements sont plus importantes du côté aortique de la valve, là où la vitesse du passage du sang est plus élevée et où le *shear stress* est oscillatoire<sup>7,8</sup>. Il est également intéressant de noter<sup>7</sup> que le feuillet valvulaire non-coronarien est plus exposé aux contraintes oscillatoires que les feuillets coronariens droit et gauche, prédisposant ainsi ce feuillet au développement de l'épaississement valvulaire et du rétrécissement aortique<sup>6,8</sup> (figure 5C).



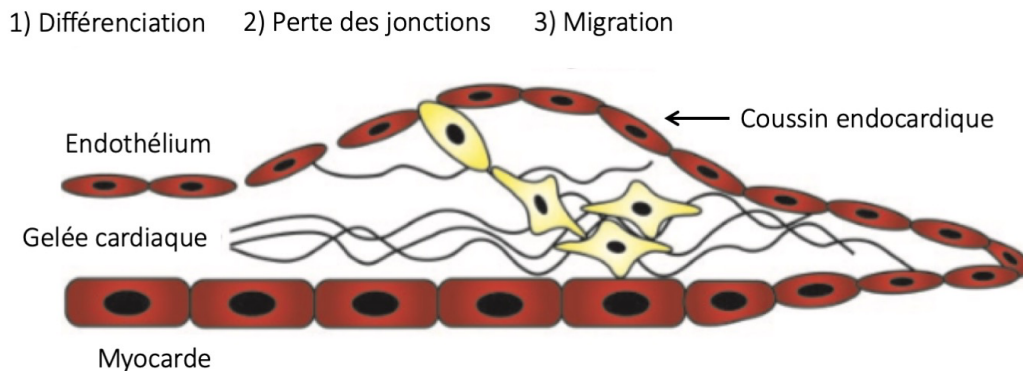
**Figure 5** : Représentation des différentes forces mécaniques subies par la valve aortique, en coupe frontale lors de la systole (A), lors de la diastole (B, C) et en coupe transversale lors de la diastole (C). (d'après M. Bäck et coll., *Cardiovasc. Res.*, 2013<sup>6</sup>)

### 3. Physiologie de la valve aortique

#### a. Développement de la valve aortique

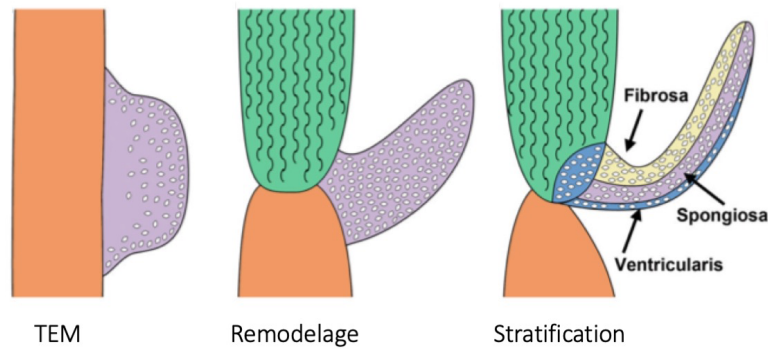
Au cours du développement embryonnaire, le cœur est le premier organe à se développer et à fonctionner. Initialement, le tube cardiaque primitif est formé d'une couche externe de cellules myocardiques et d'une couche interne de cellules endothéliales, séparées par de la matrice extracellulaire (MEC), aussi appelée gelée cardiaque. Le tube cardiaque va ensuite s'allonger et se cloisonner afin de former les oreillettes et les ventricules<sup>9</sup>. C'est au cours de cette phase que la valve va commencer à se former. Un signal provenant des cellules myocardiques va induire la transition endothélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules endothéliales (figure 6).

La TEM est initiée par l'expression myocardique de BMP-2 et endocardique de TGF $\beta$  et de Notch1<sup>10,11</sup>. Cette TEM va se dérouler en trois étapes : *i*) les cellules endothéliales vont se différencier, *ii*) perdre leurs jonctions intercellulaires et *iii*) migrer dans la gelée cardiaque<sup>9,10,12</sup>.



**Figure 6 : Développement de la valve aortique.**  
(d'après E. J. Armstrong et coll., *Circ. Res.*, 2004<sup>9</sup>)

La valvulogénèse se poursuit avec le remodelage des coussins endocardiques. Ces derniers vont s'allonger puis s'amincir pour former la valve aortique<sup>9,13,14</sup> (figure 7). Cette maturation des feuillets valvulaires est notamment caractérisée par une complexification et une réorganisation trilaminaire de la MEC. La composition et la disposition des différentes couches des feuillets valvulaires sont essentielles au fonctionnement normal de la valve aortique. Une anomalie dans la structure des feuillets entraîne des malformations ou l'apparition de pathologies au moment de la naissance ou au cours de la vie adulte<sup>13</sup>.



**Figure 7 : Remodelage de la valve aortique.**  
(d'après E.E. Wrigg et coll., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2014<sup>14</sup>)

### b. Structure histologique des feuillets valvulaires aortiques

Au niveau histologique, les feuillets valvulaires sont constitués d'une MEC très dense, délimitée en trois couches distinctes : la fibrosa, la spongiosa et la ventricularis (figure 7). Chacune de ces différentes couches possède une composition et une organisation spécifique<sup>12,14</sup> (figure 8).

#### i. La fibrosa

La fibrosa est située sur la face aortique du feuillet valvulaire. Elle est composée de fibres de collagène de type I orientées de manière circonférentielle. Cette organisation lui confère une certaine rigidité ce qui lui permet de supporter une pression transvalvulaire importante lorsque la valve est fermée (figure 8).

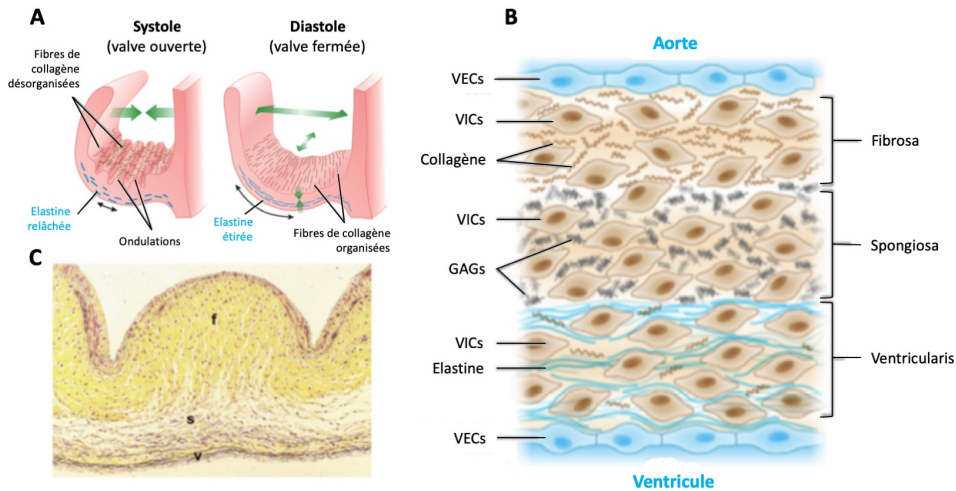
#### ii. La spongiosa

La spongiosa est principalement composée de glycosaminoglycanes (GAG) et de protéoglycanes. Elle favorise le glissement de la fibrosa et de la ventricularis lorsqu'elles se déforment. Elle apporte ainsi une résistance importante à la compression lors de la mise en mouvement de la valve pendant le cycle cardiaque.

#### iii. La ventricularis

La ventricularis est située sur la face ventriculaire du feuillet valvulaire et est exposée au flux sanguin pulsatile. Elle contient des fibres d'élastine afin d'augmenter la flexibilité de la valve notamment lors de sa fermeture (figure 8).

Ces différences structurelles confèrent à la valve une très grande résistance et assure ainsi son bon fonctionnement au cours du temps<sup>15-17</sup>.



**Figure 8 : Structure d'un feuillet valvulaire aortique.** (A) Représentation schématique de l'organisation des fibres de collagène et d'élastine lorsque la valve est ouverte ou fermée. (B) Organisation des composants de la MEC dans un feuillet valvulaire normal. (C) Coupe histologique d'un feuillet valvulaire : fibrosa (f), spongiosa (s) et ventricularis (v), coloration au Pentachrome de Movat (d'après E. Aikawa et coll., *Cell Mol Path of Cardiovasc Dis.*, 2014<sup>17</sup>)

### c. Les composants cellulaires

Les feuillets valvulaires sont constitués majoritairement des cellules valvulaires interstitielles (VICs, *valvular interstitial cells*) et sont tapissés sur la face ventriculaire et aortique par une monocouche unicellulaire de cellules valvulaires endothéliales (VECs, *valvular endothelial cells*), formant l'endothélium valvulaire aortique.

#### i. Les cellules endothéliales valvulaires (VECs)

Les VECs jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie valvulaire. Les VECs, comme les autres cellules endothéliales (CEs) expriment le facteur de von Willebrand (vW) et sont capables de maintenir une surface de contact sanguin non thrombogène et de communiquer avec les VICs sous-jacentes.

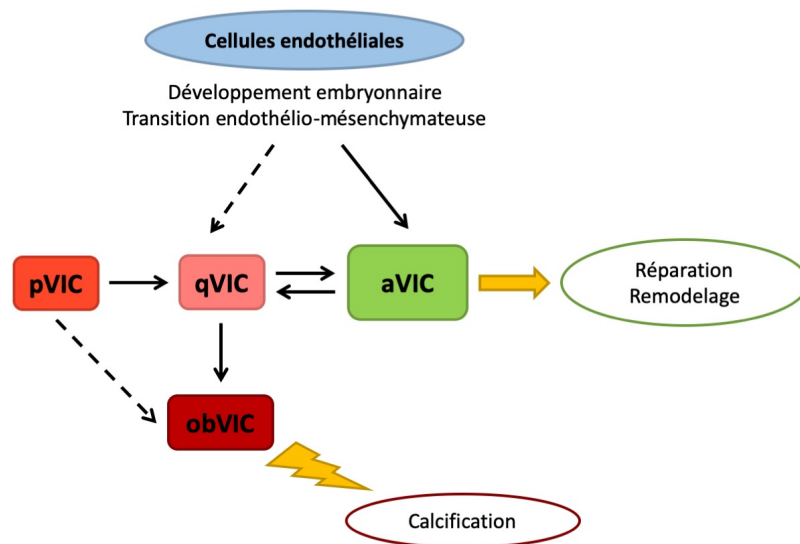
Des études de comparaison de l'endothélium valvulaire et vasculaire ont cependant démontré que ces deux endothéliums diffèrent par de nombreux gènes, suggérant que les VECs ont un phénotype endothélial bien distinct de celui des autres CEs<sup>18</sup>. Contrairement aux CEs, qui s'alignent parallèlement à la direction de l'écoulement sanguin, les VECs s'alignent perpendiculairement au flux sanguin<sup>18,19</sup>. Cette différence d'orientation cellulaire est associée à une réorganisation du cytosquelette qui va permettre aux VECs de détecter le sens de l'écoulement sanguin, et, en réponse au *shear stress*, vont activer de nombreuses voies de signalisation telles que la sécrétion de monoxyde d'azote (NO) ou d'endothéline-1 (ET-1)<sup>13,19</sup>. Les VECs, tout comme les CEs, possèdent un grand nombre de gènes impliqués dans la réponse oxydative. Cependant, les mécanismes impliqués dans la calcification valvulaire diffèrent de



ceux impliqués dans les vaisseaux. Les VECs expriment davantage des gènes chondrogéniques, alors que les CEs expriment davantage de gènes associés à l'ostéogenèse<sup>13,20</sup>.

### ii. Les cellules interstitielles valvulaires (VICs)

Au cours du développement embryonnaire, les VICs proviennent de la transition endothélio-mésenchymateuse des cellules souches embryonnaires et mésenchymateuses<sup>21</sup>. Dans la valve aortique mature, les VICs peuvent être subdivisées en cinq phénotypes : les progéniteurs des cellules endothéliales et mésenchymateuses, les VICs dérivées des cellules souches (pVICs), les VICs quiescentes (qVICs), les VICs activées (aVICs) et les VICs ostéoblastiques (obVICs) (figure 9). Les changements phénotypiques des VICs sont essentiels au maintien de l'homéostasie valvulaire normale, mais ils sont cependant également impliqués dans la pathogenèse des calcifications valvulaires aortiques. La communication entre les VICs est ainsi essentielle pour réguler leurs phénotypes et leurs fonctions<sup>22</sup>.



**Figure 9 : Origine et phénotype des cellules interstitielles valvulaires.** pVICs, VICs progénitrices ; qVICs, VICs quiescentes ; aVICs, VICs activées ; obVICs, VICs ostéoblastiques (adapté de A. Liu et coll., *Am. J. of Pathology*, 2007<sup>23</sup>)

#### ◇ Les VICs progénitrices (pVICs)

Les VICs progénitrices sont les cellules les moins bien décrites et se composent d'une population très hétérogène, importante pour la réparation valvulaire. Les pVICs proviennent de différentes origines : elles peuvent être issues de la moelle osseuse, être recrutées depuis la circulation sanguine ou être naturellement présentes dans la valve<sup>24</sup>. Chez l'adulte, les pVICs sont capables de se différencier et ainsi permettre le renouvellement cellulaire normal et pathologique en réponse aux lésions valvulaires<sup>25,26</sup>. Les cellules progénitrices sont également

capables de se différencier en cellules ostéogéniques, pouvant ainsi contribuer au développement de la calcification aortique<sup>24</sup>.

◇ Les VICs quiescentes (qVICs)

Les qVICs sont les cellules qui sont au repos dans la valve aortique mature. Elles permettent le maintien de la structure et de la fonction de la valve *via* le renouvellement lent et continu de la MEC<sup>21</sup>. Lors d'une lésion valvulaire, les qVICs s'activent en aVICs qui vont participer à la réparation active de la valve. Dans des conditions favorisant la calcification valvulaire, c'est-à-dire lorsque les qVICs sont en présence de facteurs chondrogéniques et ostéogéniques, elles sont également capables de se différencier en VICs ostéoblastiques<sup>24,26</sup>.

◇ Les VICs actives (aVICs)

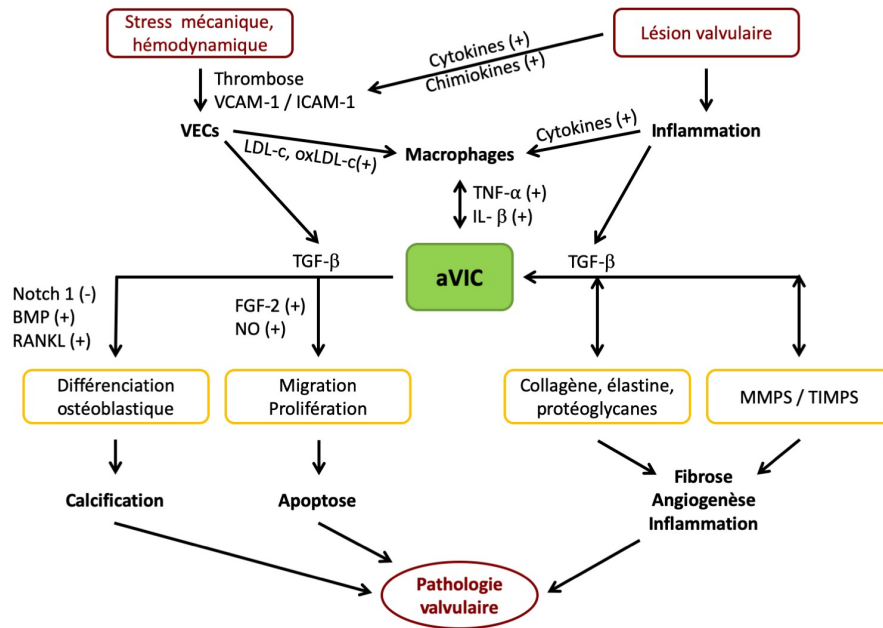
En conditions physiologiques, les VICs actives sont très peu présentes dans la valve aortique. C'est en réponse aux lésions valvulaires que les aVICs, issues des qVICs, vont proliférer et migrer afin d'assurer la réparation et le remodelage de la valve pathologique. Ces aVICs sont des cellules positives pour l' $\alpha$ SMA (*alpha-smooth muscle actin*) présentant les caractéristiques des myofibroblastes<sup>23</sup>.

En réponse au stress hémodynamique et/ou mécanique et aux lésions valvulaires, les VICs sont activées par les médiateurs libérés par les VECs tels que le NO ou l'endothéline-1 et par l'inflammation avec la libération de cytokines et de chimiokines, ainsi qu'avec l'activation de macrophages<sup>27,28</sup> (figure 10).

L'activation des VICs est associée à une augmentation de la formation et de la dégradation de la MEC, à une augmentation des métalloprotéinases (MMPs) et des inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs, *tissue inhibitors of metalloproteinases*), une augmentation de la migration et de la prolifération cellulaire notamment régulée par le NO et le FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*)<sup>23</sup> (figure 10).

Lorsque la réparation valvulaire est achevée, les aVICs sont éliminées par apoptose. Cependant, lors d'un dysfonctionnement de la régulation de l'apoptose, la MEC est produite de manière continue, ce qui entraîne une fibrose pathologique et un remodelage anormal, conduisant *in fine* à l'angiogenèse, l'inflammation et la calcification valvulaire<sup>20,27,28</sup>.





**Figure 10** : Déterminants de l'activation des VICs lors de lésions valvulaires. (adapté de A. Liu et coll., *Am. J. of Pathology*, 2007<sup>23</sup>)

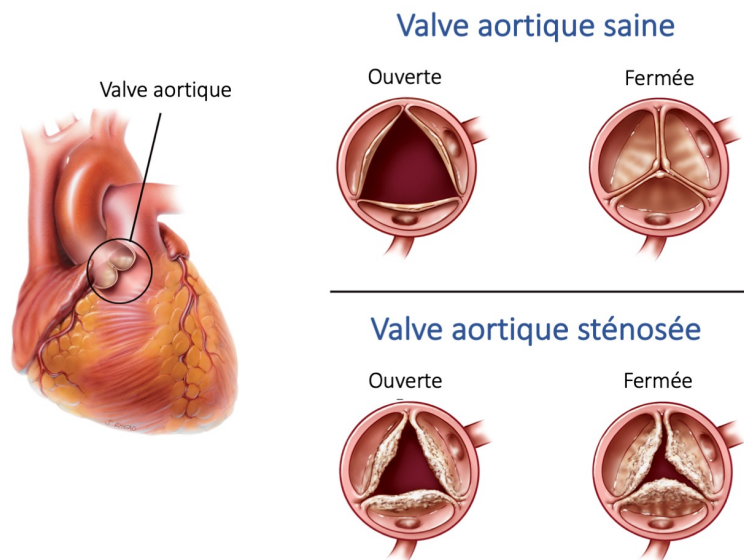
#### ◇ Les VICs ostéoblastiques (obVICs)

Les obVICs régulent la chondrogenèse et l'ostéogenèse dans les processus pathologiques. Elles sont caractérisées par l'expression de marqueurs indiquant la différenciation ostéoblastique tels que l'ostéopontine (OPN), l'ostéocalcine (OCN), la phosphatase alcaline (ALP), la sialoprotéine osseuse (BSP) et les protéines morphogéniques osseuses (BMP). Bien qu'elles possèdent de nombreux marqueurs de l'ostéogenèse et de la chondrogenèse, les obVICs ne deviennent pas de vrais ostéoblastes, et il n'est pas encore bien établi si les VICs passent préalablement par un stade aVICs avant de devenir obVICs<sup>29</sup>. Cependant, il est bien défini que l'activation des voies de signalisation de BMP et de Notch1 joue un rôle important dans la différenciation ostéoblastique des VICs et dans la calcification valvulaire<sup>21,23</sup> (cf. partie II.7.d.ii.) (figure 10).

## II-LE RÉTRÉCISSEMENT AORTIQUE CALCIFIÉ

### 1. Généralités

Le rétrécissement aortique calcifié (RAC), aussi appelé sténose aortique, est la valvulopathie la plus fréquente dans les pays occidentaux<sup>30</sup>. Le RAC est une maladie lentement évolutive caractérisée par le remodelage fibrocalcique de la valve. Elle débute par un épaissement progressif des feuillets associé à une fonction valvulaire normale, c'est la sclérose aortique. L'épaississement des feuillets valvulaires est suivi par la formation de nodules de calcium, associée dans les derniers stades de la maladie à la formation de néo-vaisseaux sanguins et d'os. La calcification des feuillets provoque la réduction de la surface de l'orifice aortique ce qui interfère avec l'ouverture et la fermeture de la valve, gênant l'écoulement ventriculaire gauche<sup>22,31</sup> (figure 11).



**Figure 11** : Représentation schématique d'une valve aortique saine et sténosée.  
(d'après le site Health Jade [en ligne] <https://healthjade.net/aortic-valve-stenosis/>)

### 2. Épidémiologie

La sclérose aortique est très fréquente et représente environ 25 à 30% des sujets âgés de plus de 65 ans, et près de 50% des sujets de plus de 85 ans. La sténose aortique est la valvulopathie la plus fréquente affectant environ 2% des sujets de plus de 65 ans et sa prévalence augmente avec l'âge ; on estime que la prévalence de cette valvulopathie est d'environ 3 à 9% après 80 ans<sup>32,33</sup>. Compte tenu du vieillissement global de la population, il est estimé que sa prévalence augmentera considérablement au cours des prochaines décennies. C'est pourquoi le RAC représente un important problème de santé publique<sup>30,34</sup>.

### 3. Étiologie

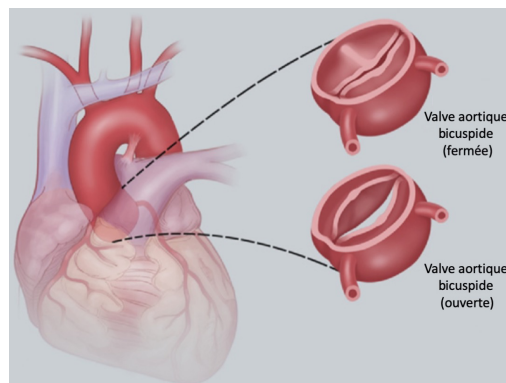
On trouve principalement trois étiologies au RAC : *i)* la première cause, la plus fréquente est dégénérative ; *ii)* la deuxième est la bicuspidie aortique, une malformation congénitale ; *iii)* et la dernière cause est d'origine rhumatismale.

#### a. Le RAC d'origine dégénérative

Le RAC dégénératif, également appelé maladie de Mönckeberg, est la forme la plus fréquemment rencontrée. Ce RAC est la conséquence d'un épaissement sous-endothélial et de la calcification progressive des feuillets valvulaires. La rigidité de la valve est ainsi responsable de contraintes hémodynamiques qui aggravent avec le temps les lésions valvulaires<sup>35</sup>.

#### b. Malformation congénitale de la valve : la bicuspidie valvulaire aortique

La bicuspidie aortique (BA) est la malformation valvulaire congénitale (autosomique dominante) la plus courante et elle touche préférentiellement les hommes<sup>35,36</sup>. Sa prévalence est variable selon les ethnies et elle est estimée dans la population générale entre 0,5 et 2%. C'est l'étiologie la plus fréquente du rétrécissement aortique chez les sujets de moins de 65 ans<sup>33</sup>. La BA résulte de la formation anormale des feuillets aortiques au cours de la valvulogénèse. La valve bicuspide est composée de deux feuillets de taille inégale, où le plus grand feuillet résulte de la fusion des commissures de deux sigmoïdes<sup>36</sup> (figure 12). L'anatomie bicuspide conduit à une usure plus rapide des valves en raison des contraintes oscillatoires qu'elle génère. Ainsi, à l'âge adulte, la BA représente un facteur de risque important dans le développement de la sténose aortique. Cette malformation valvulaire peut évoluer soit vers le RAC, soit vers l'insuffisance aortique et peut être associée à un anévrisme de l'aorte ascendante<sup>35</sup>.



**Figure 12 : Représentation schématique d'une valve aortique bicuspide.**  
(d'après S. Siu et coll., *J. of the Am. College of Cardiology*, 2010<sup>36</sup>)

### c. Le RAC d'origine rhumatismale

Le RAC d'origine rhumatismale est d'évolution très lente et est de plus en plus rare dans les pays occidentaux en raison de la disparition du rhumatisme articulaire. Il est provoqué par une complication inflammatoire due à l'infection au streptocoque pyogène *Streptococcus β-hémolytique* du groupe A<sup>35</sup>. Il s'agit d'une maladie auto-immune médiée par les lymphocytes T provoquant une endocardite rhumatismale qui altère les feuillets valvulaires aortiques<sup>37</sup>.

## 4. Facteurs de risques et prédisposition génétique

### a. Facteurs de risques

Les facteurs de risques de la sténose aortique sont similaires à ceux de l'athérosclérose. La sténose aortique est fortement associée à l'âge du patient, au sexe masculin, au tabagisme, à l'hypertension artérielle, à l'hypercholestérolémie, à l'obésité, au syndrome métabolique, au diabète et à un niveau élevé en Lp(a) (lipoprotéine a)<sup>38,39</sup>.

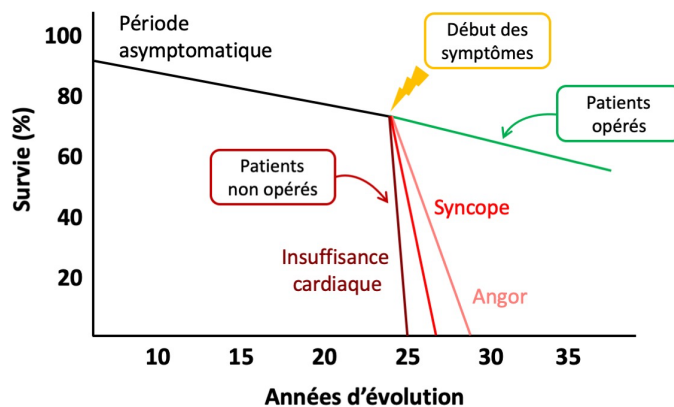
### b. Prédisposition génétique

Plusieurs études ont montré que le RAC est associé à plusieurs facteurs génétiques. *Garg et coll.* ont démontré le caractère héréditaire des mutations du gène *NOTCH1* dans le développement de valves aortiques bicuspidées<sup>40</sup>. Les mutations sur ce gène entraînent un développement anormal de la valve ainsi que sa calcification<sup>40,41</sup>. L'équipe de *Ortlepp et coll.* a montré une association entre l'allèle B du récepteur à la vitamine D et le RAC ; où l'allèle B serait plus fréquent chez les patients atteints d'une sténose aortique calcifiée<sup>42</sup>. D'autres facteurs génétiques ont également été suggérés comme facteurs pouvant prédisposer au RAC : le récepteur alpha des œstrogènes ( $ER\alpha$ , *estrogen receptor α*)<sup>43</sup>, le facteur de croissance transformant bêta ( $TGF-\beta$ , *transforming growth factor β*)<sup>43</sup> ou encore l'apolipoprotéine E (ApoE)<sup>44</sup>.

## 5. Diagnostic du RAC

### a. Symptomatologie clinique

Le RAC est une maladie lentement évolutive qui reste longtemps asymptomatique. Le diagnostic est généralement retardé et le pronostic d'un patient symptomatique sans opération est extrêmement mauvais avec une mortalité de l'ordre de 80% à deux ans en l'absence de traitement. Les premiers signes fonctionnels apparaissent après une longue période asymptomatique et sont le reflet de l'aggravation du RAC<sup>45,46</sup> (figure 13).



**Figure 13 :** Survie après apparition des symptômes chez les patients opérés et non opérés. (adapté de F. Lévy et coll., *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 2005<sup>46</sup>)

Les manifestations cliniques surviennent surtout pendant l'effort<sup>35,47</sup> et se caractérisent par :

#### *i. L'angor*

L'angor se caractérise par des douleurs thoraciques semblables à celles d'une maladie coronarienne et apparaît généralement à l'effort.

#### *ii. La dyspnée*

La dyspnée à l'effort est le symptôme le plus fréquent. Elle est principalement liée à l'incapacité du cœur à augmenter son débit à l'effort.

#### *iii. La syncope et la lipothymie*

La syncope est une perte de connaissance totale, le plus souvent de courte durée. La lipothymie quant à elle est une simple sensation de malaise sans perte de connaissance. Elles sont toutes deux déclenchées par l'effort. Ces malaises sont causés par une incapacité du cœur à augmenter le volume d'éjection ventriculaire au cours de l'effort, entraînant une vasodilatation périphérique, une hypotension et une diminution de la perfusion cérébrale.

#### **b. Signes échocardiographiques**

L'échocardiographie couplée au doppler est la technique privilégiée dans le diagnostic et l'évaluation des maladies valvulaires et est la principale méthode d'imagerie non-invasive utilisée pour évaluer la sévérité du RAC, notamment grâce à la mesure des vitesses et des gradients transvalvulaires et le calcul de la surface valvulaire aortique. Ainsi, un gradient moyen transvalvulaire aortique (AoGmoy) supérieur à 40mmHg, une vitesse maximale du flux (AoVmax) supérieure à 4m/s et une surface valvulaire aortique inférieure à 1 cm<sup>2</sup> définissent une sténose aortique serrée<sup>48</sup> (figure 14).

Paramètres échocardiographiques	Sténose aortique		
	Normale	Modérée	Sévère
Surface valvulaire aortique (cm <sup>2</sup> )	3,0 - 4,0	1,0 - 1,5	< 1,0
Jet de vélocité (m/s)	< 2,5	3,0 - 4,0	> 4,0
Gradient transvalvulaire aortique moyen (mmHg)	< 20	20 - 40	> 40

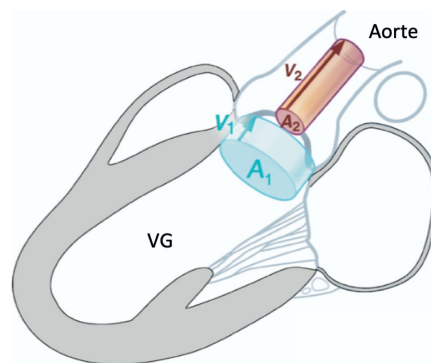
**Figure 14** : Classification de la sévérité de la sténose aortique valvulaire.  
(adapté de K.K. Stout et coll., *J. Intensive Care Med.*, 2007<sup>47</sup>)

### i. Surface valvulaire aortique

La surface aortique valvulaire normale chez l'adulte se situe entre 3 et 4 cm<sup>2</sup>. En cas de sténose aortique sévère, elle peut diminuer jusqu'à atteindre une surface inférieure à 1 cm<sup>2</sup> (figure 14). La surface de la valve aortique peut être calculée à l'échocardiographie couplée au doppler suivant l'équation de continuité :

$$A_2 = \frac{A_1 \times v_1}{v_2}$$

Ainsi, la surface valvulaire aortique (A<sub>2</sub>) est égale au produit de l'aire de la chambre de chasse du VG (A<sub>1</sub>) par la vitesse du flux sanguin à la sortie du VG (v<sub>1</sub>), divisée par la vitesse du flux sanguin à travers la valve aortique (v<sub>2</sub>)<sup>45,47</sup> (figure 15).



**Figure 15** : Représentation de l'équation de continuité pour le calcul de la surface valvulaire aortique.

A<sub>1</sub> : aire de la chambre de chasse du ventricule gauche ; v<sub>1</sub> : vitesse du flux sanguin à la sortie du ventricule gauche ;

A<sub>2</sub> : aire de la valve aortique ; v<sub>2</sub> : vitesse du flux sanguin à travers la valve aortique.

(d'après H. Baumgartner et coll., *J. of the Am. Society of Echocardiography.*, 2009<sup>45</sup>)

### ii. Le jet de vélocité (AoVmax)

Le jet de vélocité est la vitesse maximale du flux sanguin mesurée à travers la valve aortique (AoVmax, vitesse maximale transvalvulaire aortique). Le jet de vélocité est mesuré en doppler continu en coupe apicale. Dans des conditions physiologiques, cette vitesse est inférieure à 1 -

1,5 m/s. Une vitesse maximale supérieure à 2,5 m/s définit une sténose aortique et est supérieure à 4 m/s dans le cas d'une sténose aortique sévère<sup>45,47</sup> (figure 14).

### *iii. Le gradient de pression transaortique*

Le gradient de pression transaortique moyen est le reflet de la différence de pression entre le VG et l'aorte en systole. Le gradient maximal est calculé en utilisant l'équation de Bernoulli simplifiée :

$$\Delta P = 4v^2$$

où  $v$  est obtenue à partir des vitesses moyenne (AoVmoy) ou maximale (AoVmax) du jet de vélocité mesurées en doppler. On mesure également à l'échographie le gradient moyen (AoGmoy) et on considère habituellement que la sténose aortique est serrée quand ce gradient est supérieur à 40 mmHg<sup>45,47</sup>.

### *iv. Autres signes mesurés par écho-doppler*

L'obstruction valvulaire aortique entraîne une hypertrophie ventriculaire gauche compensatrice pour normaliser les contraintes. L'hypertrophie du VG se caractérise par une petite cavité et des parois ventriculaires épaisses ainsi qu'un dysfonctionnement diastolique. Elle est évaluée par écho-doppler par la mesure de l'épaisseur du septum interventriculaire et de la paroi postérieure du VG (mm). La fonction systolique du VG est quant à elle longtemps préservée et son altération est généralement tardive. La fonction systolique est habituellement estimée par le calcul de la fraction d'éjection du VG (FEVG)<sup>45,48</sup>.

## 6. Prise en charge du RAC

Il n'y a à ce jour aucun traitement permettant de ralentir ou stopper la progression de cette valvulopathie. En cas de rétrécissement aortique serré et symptomatique, le seul traitement actuellement disponible consiste à remplacer la valve pathologique, soit par chirurgie (remplacement valvulaire aortique, RVA), ou par implantation d'une bioprothèse aortique par voie percutanée (TAVI).

### *a. Les essais thérapeutiques*

Malgré les nombreuses études portant sur la compréhension de la physiopathologie du RAC, il n'existe à ce jour aucun traitement pharmacologique permettant de ralentir ou de stopper la progression du RAC. En raison des similarités physiopathologiques entre le RAC et

l'athérosclérose (*cf. partie II.7.b.*), deux formes de traitements pharmacologiques ont fait l'objet d'essais cliniques : *i*) les statines, des inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase), et *ii*) des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE-I, *angiotensin-converting enzyme inhibitor*).

#### *i. Les statines*

Les statines ont été le traitement médicamenteux le plus étudié dans le RAC. Les essais cliniques ont montré que les statines réduisent la mortalité chez les patients atteints d'athérosclérose en prévention primaire et secondaire. Les premières études réalisées chez l'animal et chez l'homme ont montré que le traitement par les statines était associé à un ralentissement de la progression de la sténose aortique ainsi qu'à une diminution de l'inflammation et du niveau de LDL (*low density lipoprotein*) sérique<sup>49-51</sup>. Secondairement, tous les essais thérapeutiques randomisés portant sur les statines ont échoué et n'ont démontré aucun bénéfice pour réduire la progression du RAC<sup>52,53</sup>.

#### *ii. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE-I)*

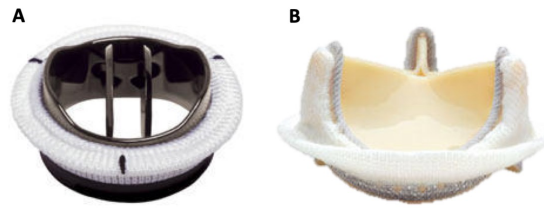
L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) est présente au niveau des lésions valvulaires et participe au développement de la sténose aortique<sup>54</sup>. *Ngo et coll.* ont par ailleurs montré dans un modèle de sténose aortique chez le lapin que les ACE-I limitent la dysfonction endothéliale et retarde le développement du RAC<sup>55</sup>. Cependant, ces résultats ont été controversés dans des études rétrospectives qui n'ont pas montré de bénéfice des ACE-I dans la progression de la sténose aortique, qu'elle soit modérée ou sévère<sup>50,56</sup>.

### **b. Traitement chirurgical**

#### *i. Le remplacement valvulaire aortique*

Le remplacement valvulaire aortique conventionnel consiste à enlever la valve calcifiée et à la remplacer par une prothèse valvulaire mécanique ou biologique. La prise en charge du RAC est régulièrement actualisée dans les recommandations des sociétés savantes (ESC, *European Society of Cardiology* ; ACC/AHA, *American College of Cardiology / American Heart Association*)<sup>48,57</sup>. Le choix de l'intervention chirurgicale repose sur de multiples facteurs tels que le risque chirurgical, l'âge du patient et la présence de comorbidités. Ainsi, chez les patients de moins de 60 ans, la valve pathologique est préférentiellement remplacée par une prothèse mécanique (figure 16A), tandis qu'une prothèse biologique, possédant une durée de vie limitée, sera plutôt utilisée chez les patients âgés de plus de 65 ans (figure 16B).

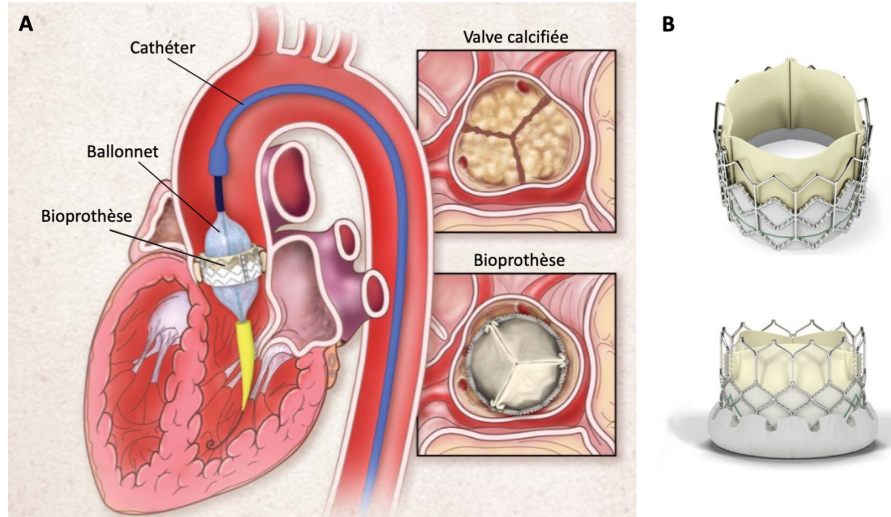




**Figure 16 : Différents types de prothèses valvulaires aortiques.**  
 (A) Prothèse mécanique (On-X's Mechanical), (B) Bioprothèse (Edwards Bioprosthetic).

## ii. Le TAVI

Au cours de ces dernières années, une nouvelle méthode de remplacement valvulaire aortique moins invasive s'est développée : le remplacement par voie percutanée. C'est en 2002 que l'équipe du Professeur Alain Cribier réalisait le premier TAVI (*transcatheter aortic valve implantation*)<sup>58</sup>. Depuis, le remplacement valvulaire par TAVI a révolutionné la prise en charge des patients à haut risque présentant une sténose aortique sévère. Cette procédure consiste à insérer un cathéter contenant la bioprothèse par voie endovasculaire, dans 90% des cas *via* l'artère fémorale en le guidant jusqu'au cœur. Une fois en place, la bioprothèse est déployée par gonflage du ballonnet et vient écraser la valve native calcifiée qui sert de point d'ancrage à la bioprothèse mplantée<sup>59,60</sup> (figure 17).



**Figure 17 : Représentation d'un remplacement valvulaire aortique par voie percutanée.** (A) Étape finale du remplacement valvulaire ; la bioprothèse est positionnée au niveau de la valve native calcifiée, (B) Bioprothèse Edwards.  
 (adapté de C. R. Smith et coll., *N. Engl. J. Med.*, 2011<sup>59</sup>)

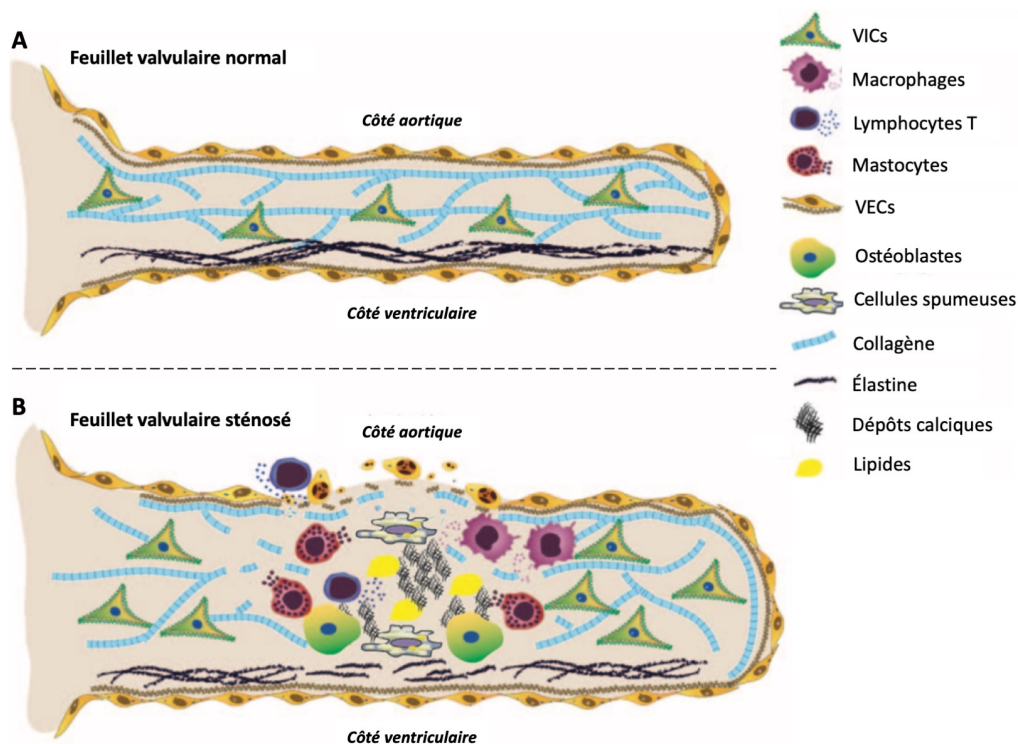
## 7. Physiopathologie du RAC

Le RAC a longtemps été considéré comme un processus dégénératif passif lié à l'âge entraînant une accumulation progressive de calcium au niveau de la valve aortique. Bien que la sténose aortique soit plus fréquente chez le sujet âgé, elle n'est cependant pas la conséquence inévitable

du vieillissement. De nombreuses études ont montré que le RAC est au contraire un processus pathologique actif et hautement régulé<sup>61,62</sup>.

### a. Généralités

La physiopathologie du RAC est caractérisée dans un premier temps par des lésions endothéliales suivie par une infiltration de lipides et de cellules inflammatoires dans la valve. De ces événements précoces résultent une prolifération et une transformation des VICs, un remodelage et une surproduction de MEC, une calcification active de la valve aortique<sup>62-64</sup> (figure 18). Ces mécanismes sont également retrouvés dans l'athérosclérose vasculaire, cependant, malgré les nombreuses similitudes physiopathologiques, seulement environ 50% des patients présentant un RAC présentent une athérosclérose associée<sup>65</sup>.



**Figure 18** : Représentation d'une coupe d'un feuillet valvulaire aortique, normal (A) et sténosé (B)  
(adapté de S. Helske et coll., *Curr. Opin. Lipidol.*, 2007<sup>62</sup>)

### b. Similarité entre RAC et athérosclérose

Les études menées sur le RAC montrent que sa pathogenèse est un processus actif qui ressemble à celui de l'athérosclérose. La sténose aortique est une maladie athéro-inflammatoire due aux dépôts de lipoprotéines dans les lésions ainsi que l'infiltration de cellules inflammatoires. Pour rappel, le RAC partage de nombreux facteurs de risques avec l'athérosclérose comme le sexe masculin, le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et le diabète<sup>38,39</sup>.

Malgré ces similitudes, il existe cependant des différences entre les caractéristiques de ces deux maladies (tableau 1). Au niveau tissulaire et cellulaire, on retrouve peu de cellules musculaires lisses (CML) mais de nombreux myofibroblastes dans les feuillets valvulaires aortiques. De plus, bien que des calcifications puissent être observées dans les plaques d'athérosclérose, le degré de calcification est bien plus élevé dans la valve aortique, notamment dans les stades terminaux, que dans la paroi du vaisseau. Cependant, les différences les plus importantes entre le RAC et l'athérosclérose sont les mécanismes cliniques. En effet, dans la sténose aortique, l'épaississement graduel des feuillets valvulaires et leurs calcifications entraînent un obstacle à l'éjection ventriculaire gauche. Tandis que dans l'athérosclérose, l'instabilité de la plaque conduit à sa rupture, ce qui entraîne une thrombose et une occlusion vasculaire. Ainsi ces différences suggèrent que les mécanismes physiopathologiques sous-jacents diffèrent entre le RAC et l'athérosclérose, expliquant le développement des lésions valvulaires cliniquement différentes des lésions vasculaires<sup>65,66</sup>.

Caractéristiques	RAC	Athérosclérose
Accumulation lipoprotéines	++++	++++
Oxydation des lipides	++++	++++
Calcification	+++++	++
Inflammation	++++	++++
Type cellulaire prédominant	Fibroblastes (VICs)	Cellules musculaires lisses
Manifestation clinique	Épaississement des feuillets	Instabilité de la plaque

**Tableau 1** : Comparaison du RAC et de l'athérosclérose.  
(adapté de R. V. Freeman et coll., *Circulation*, 2005<sup>66</sup>)

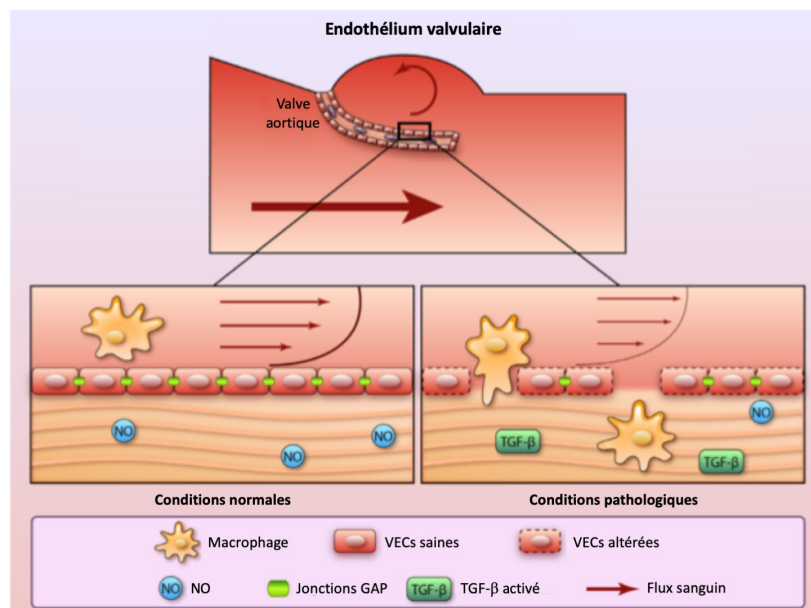
### c. Phase d'initiation du RAC

Les lésions endothéliales provoquées par les perturbations du flux sanguin et les différentes forces exercées entraînent le dépôt de lipoprotéines de basse densité dans la MEC de la valve, conduisant à l'infiltration de cellules inflammatoires telles que les macrophages, ainsi que la libération de radicaux libres et de cytokines pro-inflammatoires.

#### i. Lésions de l'endothélium

L'environnement hémodynamique de la valve aortique est une condition préalable très bien décrite pour le maintien de l'homéostasie valvulaire. En effet, les VECs permettent de maintenir

une surface de contact sanguin non thrombogène en inhibant l'expression des molécules d'adhésion cellulaire (VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine) tout en produisant du NO. Ainsi, les perturbations locales du flux sanguin causées par exemple par l'hypertension artérielle ou la bicuspidie aortique provoquent des modifications de l'écoulement sanguin et augmentent les contraintes sur la valve aortique induisant un dysfonctionnement et des lésions endothéliales<sup>6,18</sup>. De plus, il existe une corrélation entre les lésions calciques situées presque exclusivement du côté aortique du feuillet valvulaire en raison de l'environnement hémodynamique local<sup>7,8</sup> (figure 19).



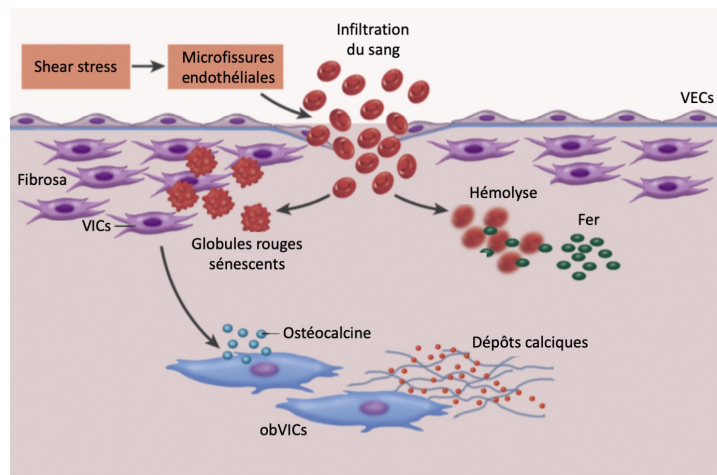
**Figure 19** : Réponses biologiques au flux sanguin en conditions normales ou pathologiques sur le versant aortique du feuillet valvulaire. NO, monoxyde d'azote ; VECs, cellules endothéliales valvulaires ; TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ . (d'après S. T. Gould et coll., *Circulation Research*, 2013<sup>7</sup>)

Les lésions endothéliales sont une caractéristique précoce du RAC. En effet, le dysfonctionnement endothélial entraîne l'infiltration et l'accumulation de macrophages et de lipoprotéines de basse densité, facilitant indirectement la formation de lésions calciques et la formation osseuse<sup>62</sup>. En plus de la minéralisation de la MEC, les VECs contribuent à l'activation, la prolifération et la transformation des VICs, ce qui entraîne un épaississement de la valve aortique<sup>12,18</sup>. Ces données renforcent l'idée que les interactions entre les VECs de l'endothélium valvulaire et les VICs sont importantes dans les mécanismes physiopathologiques du RAC.

Bien qu'il ne soit pas encore élucidé comment les lésions endothéliales valvulaires induisent directement la pathogénicité du RAC, il est néanmoins bien établi que les perturbations de l'endothélium sont une étape initiale importante dans la sténose aortique.

Le *shear stress* induit la formation de microfissures dans l'endothélium de la valve aortique<sup>67</sup>. Récemment l'équipe de Bichat a décrit ce processus de microfissuration de l'endothélium dans le RAC. La formation de brèches dans l'endothélium permet la pénétration de sang dans la fibrosa de la valve et expose ainsi les VICs aux globules rouges sénescents et ont constaté que ces globules rouges sénescents peuvent induire la différenciation ostéogénique des VICs *via* la libération du fer.

Leurs travaux ont également révélé que les dépôts ferriques sont retrouvés non seulement dans les stades précoces du RAC, mais également dans les valves non calcifiées, suggérant que les dépôts de fer pouvaient être initiateurs des processus inflammatoires et de calcification de la valve<sup>68</sup> (figure 20). Des processus de réparation sont probablement mis en jeu lors de la formation des brèches endothéliales et il est possible qu'à partir d'un certain stade les mécanismes de réparation soient insuffisants faisant le lit du développement et la progression du remodelage fibrocalcique valvulaire.



**Figure 20 :** Microfissuration de l'endothélium promouvant la calcification des feuillets valvulaires aortiques.  
(d'après M. Morvan et coll., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2019<sup>68</sup>)

### ii. Dépôts lipidiques dans la valve aortique

Les lésions et le dysfonctionnement de l'endothélium perturbent l'intégrité endothéliale, favorisant l'infiltration et l'accumulation des lipides au niveau de la fibrosa du feuillet valvulaire. Les lipoprotéines impliquées, telles que les LDL et la lipoprotéine(a) (Lp(a)), sont présentes dans les lésions valvulaires aortiques précoces et subissent une oxydation. Ces lipoprotéines oxydées sont hautement cytotoxiques et sont capables de stimuler l'activité inflammatoire et de promouvoir la calcification<sup>69,70</sup> (figure 23). De plus, il est intéressant de noter que les aVICs (VICs activées) sécrètent des glycosaminoglycanes (GAG) ce qui favorise également l'accumulation d'oxLDL (LDL oxydés)<sup>71</sup>.

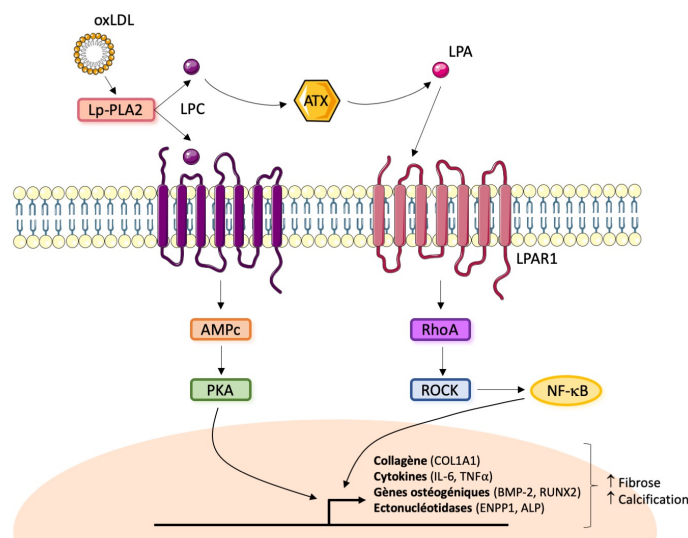


## ◇ LDL oxydés

Au cours des dernières années, plusieurs études ont mis en évidence le rôle des oxLDL comme activateurs de l'inflammation. Dans le cas de l'athérosclérose, les oxLDL déclenchent le recrutement de cellules inflammatoires et la production de cytokines telle que le TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) qui sont impliquées dans le processus de remodelage tissulaire<sup>72</sup>. Dans le RAC, *Côté et coll.* ont montré que l'augmentation du niveau d'oxLDL plasmique est associée à une augmentation du remodelage fibrocalcique du tissu valvulaire. Cependant le niveau d'oxLDL circulant n'est pas un marqueur de la progression de la sténose aortique<sup>69</sup>.

*Mahmut et coll.* ont montré que la phospholipase A2 (PLA2) associée aux lipoprotéines (Lp-PLA2) est surexprimée dans les valves sténosées de patients, et les niveaux circulants de Lp-PLA2 sont directement corrélés à la progression du RAC<sup>73,74</sup>. Le Lp-PLA2 convertit les oxLDL en lysophosphatidylcholine (LPC). De plus, il a été montré *in vitro* que le LPC est un promoteur de la calcification *via* la voie de signalisation AMPc/PKA<sup>73</sup> (figure 21).

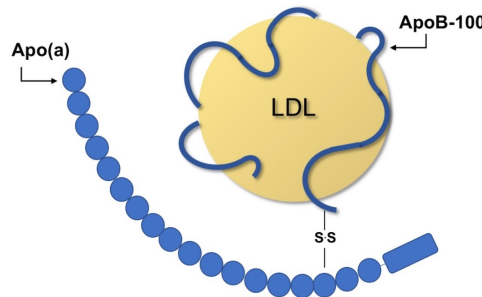
La LPC peut ensuite être transformée en acide lysophosphatidylrique (LPA) par l'autotaxine (ATX) qui est sécrétée par les aVICs. La LPA va promouvoir un programme ostéogénique dans la valve aortique *via* la voie de signalisation LPAR1 / RhoA / ROCK / NF- $\kappa$ B et ainsi induire la transcription des gènes de la calcification. Par conséquent, les VICs entament une différenciation ostéogénique conduisant à des dépôts calcaires et à la formation de nodules calcaïques<sup>75</sup> (figure 21).



**Figure 21 : Implication des lipides et de leurs dérivés dans le RAC.** AMPc, adénosine monophosphate cyclique ; ATX, autotaxine ; Lp-PLA2, lipoprotéine associée à la phospholipase A2 ; LPA, acide lysophosphatidylrique ; LPAR1, récepteur de type 1 à l'acide lysophosphatidylrique ; LPC, lysophosphatidylcholine ; NF- $\kappa$ B, nuclear factor-kappa B ; oxLDL, LDL oxydés ; PKA, protéine kinase A ; RhoA, Ras homolog family member A ; ROCK, Rho-associated protein kinase. (adapté de A. Hulin et coll., *Front. Cardiovasc. Med.*, 2018<sup>71</sup>)

### ◇ Lipoprotéine(a)

Lp(a) est une particule de type LDL liée à une apolipoprotéine(a) par un pont disulfure à l'apolipoprotéine B (figure 22). Il est connu depuis des années que des niveaux plasmatiques élevés en Lp(a) sont associés à un risque accru de sténose aortique<sup>76,77</sup>. Ces résultats sont intéressants compte tenu que la Lp(a) est le principal transporteur des phospholipides oxydés (oxPL)<sup>78</sup>. Par ailleurs, *Yu et coll.* ont montré que la Lp(a) induit la différenciation des VICs *via* l'induction de la phosphatase alcaline et de médiateurs pro-ostéogéniques tels que l'ostéocalcine, Runx2, BMP-2 et Wnt. Les auteurs ont également montré que la calcification implique l'activation de la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) afin de permettre la différenciation des ostéoblastes<sup>76</sup>.



**Figure 22** : Représentation schématique de la structure de la lipoprotéine(a).

### iii. Pénétration des cellules circulantes inflammatoires

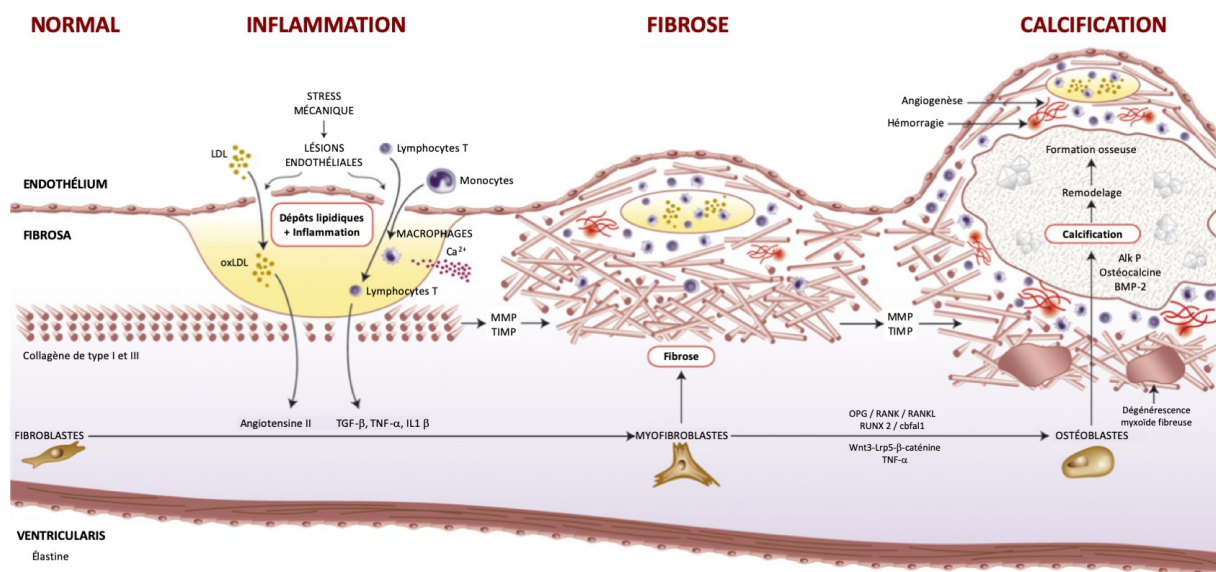
Dans la valve aortique normale on retrouve peu de macrophages et de mastocytes résidents. Les lésions endothéliales et l'infiltration des lipides dans la valve déclenchent l'inflammation au sein du feuillet. Les brèches endothéliales et l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine) permettent l'infiltration des monocytes dans la couche endothéliale. Les monocytes se différencient ensuite en macrophages et en lymphocytes T et libèrent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TGF- $\beta$ , le TNF $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL1 $\beta$ . Ces cytokines pro-inflammatoires vont favoriser la sécrétion de l'IL-8 et de MCP-1 ainsi que des molécules d'adhésion, favorisant le mécanisme d'autorecrutement des cellules immunitaires<sup>79</sup>. Les cellules inflammatoires et les cytokines vont ainsi stimuler les processus fibrotiques et calciques et entraîner l'augmentation de la rigidité valvulaire<sup>70</sup> (figure 23).

Parmi les cytokines, le TNF $\alpha$  joue un rôle important dans le développement de la sténose aortique. En se liant à ses récepteurs (TNFR1/2), le TNF $\alpha$  active les voies de signalisation ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*), JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), p38/MAPK et notamment NF- $\kappa$ B. En effet, le TNF $\alpha$  est considéré comme un activateur majeur de

l'inflammation médiée par la voie NF- $\kappa$ B, de l'apoptose, de la différenciation ostéogénique et de la biominéralisation<sup>80</sup>. De plus, il est intéressant de savoir que l'expression du TNF $\alpha$  est augmentée dans les valves sténosées et est corrélée avec les niveaux plasmatiques de LDL<sup>81</sup>.

Les interleukines, notamment l'IL1 $\beta$ , vont également jouer un rôle majeur dans la progression du RAC. L'IL1 $\beta$  stimule les VICs ce qui déclenche la libération d'IL-6, IL-8 et MCP-1 *via* la voie de signalisation NF- $\kappa$ B<sup>79</sup>.

*Kaden et coll.* ont montré qu'une supplémentation en IL1 $\beta$  ou en TNF $\alpha$  dans des cultures de VICs humaines induit une production excessive de MMP, établissant ainsi le lien entre l'inflammation et le remodelage de la MEC<sup>82,83</sup>. D'autre part, *Isoda et coll.* ont montré qu'une déficience en IL-1Ra, un antagoniste du récepteur à l'IL1 $\beta$ , est associée à des niveaux plasmatiques circulants en TNF $\alpha$  élevés, et ce, combinés à un épaissement significatif de la valve aortique<sup>84</sup>.



**Figure 23 : Processus pathologiques de la sténose aortique.**

Alk P, alcaline phosphatase ; BMP-2, bone morphogenic protein 2 ; IL1 $\beta$ , interleukine 1  $\beta$  ; MMP, métalloprotéinase ; oxLDL, LDL oxydés ; TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$  ; TIMP, inhibiteur des MMP ; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  (*d'après M. R. Dweck et coll., JACC, 2012*<sup>70</sup>)

#### iv. Production de radicaux libres

Les cytokines pro-inflammatoires altèrent le rôle protecteur de l'endothélium valvulaire en inhibant la nitrique oxyde synthase endothéliale (eNOS, *nitric oxide synthase*) et la production de monoxyde d'azote (NO), ce qui provoque une augmentation du stress oxydatif et une production des espèces réactives de l'oxygène (ERO)<sup>70,71</sup>. Le stress oxydatif contribue à



l'augmentation des oxLDL conduisant à l'activation de la voie de signalisation Wnt et à l'augmentation des niveaux d'expression de Runx2 dans les VICs et à la différenciation ostéogénique<sup>85</sup>.

#### v. Néo-angiogenèse

Les feuillets valvulaires aortiques sains sont dépourvus de vaisseaux sanguins. Cependant, les valves sténosées présentent une néo-vascularisation principalement dans les zones d'inflammation. En effet, les VICs peuvent avoir une réponse angiogénique face à la production de cytokines pro-inflammatoires telle que le TNF $\alpha$ . Les vaisseaux sanguins nouvellement formés peuvent à leur tour également influencer sur la progression du RAC en menant à une inflammation chronique et soutenue en promouvant l'infiltration des cellules inflammatoires et des lipoprotéines dans les valves sténosées<sup>86</sup>. À l'inverse, les vaisseaux lymphatiques servent de voie de sortie aux lipides et aux cellules inflammatoires. Dans l'ensemble, comme la quantité de vaisseaux lymphatiques est relativement faible comparée aux vaisseaux sanguins, ce déséquilibre favorise l'accumulation lipidique et maintient l'inflammation chronique dans les valves sténosées<sup>87,88</sup>.

Ces zones de néo-angiogenèse peuvent également être le siège d'hémorragies intravalvulaires à un stade avancé du RAC et sont soupçonnées d'être impliquées dans la progression de la pathologie. Ces hémorragies provoquent l'accumulation de fer dans le feuillet valvulaire pouvant être absorbé par les VICs. *Laguna-Fernandez et coll.* et *Morvan et coll.* ont montré que l'accumulation du fer est associée à une expression accrue des gènes du remodelage de la MEC et de la calcification, à une prolifération des VICs et à une diminution de la production d'élastine, suggérant que l'absorption du fer par les VICs pourrait favoriser la progression du RAC<sup>68,89</sup>.

#### d. Phase de progression du RAC

##### i. Remodelage fibrotique

L'une des caractéristiques du RAC est le remodelage anormal de la MEC conduisant à l'épaississement des feuillets valvulaires. En effet, dans la valve normale les fibres de collagène ont une architecture organisée, tandis que dans le RAC, elles sont produites de manière excessive, deviennent plus denses et désorganisées<sup>22,31</sup>. Le remodelage fibrotique est favorisé par la fibrose et la protéolyse de la MEC. Ces deux processus sont déséquilibrés, ce qui entraîne la formation de noyaux fibreux aléatoires au sein de la valve<sup>23,27</sup> (figure 22).

### ◇ La fibrose

Le mécanisme sous-jacent au remodelage de la MEC est la différenciation des VICs en myofibroblastes. Le TGF- $\beta$ 1 est un facteur de croissance ayant des effets anti-inflammatoires et pro-fibrotiques et son expression est augmentée dans les valves sténosées et joue un rôle clé dans le processus de différenciation myofibroblastique. La liaison du TGF- $\beta$ 1 à ses récepteurs TGF- $\beta$ R1 et TGF- $\beta$ R2 entraîne l'activation de la voie de signalisation des Smad qui se transloque dans le noyau pour moduler l'expression génique des marqueurs myofibroblastiques comme l' $\alpha$ SMA<sup>90</sup>.

### ◇ La protéolyse

Les principales classes de molécules responsables de la dégradation de la MEC sont les MMP et leurs inhibiteurs tissulaires, les TIMP. Les MMP sont sécrétées par plusieurs types cellulaires tels que les myofibroblastes, les macrophages et les lymphocytes T. En plus des MMP et des TIMP, le remodelage et la dégradation de la MEC sont également régulés par les cathepsines S/K/V. L'expression accrue des MMP et des cathepsines vont dégrader le collagène et l'élastine de la valve pour former des fragments de collagène pro-inflammatoires et des fragments d'élastine pro-calcifiants. La réduction de la teneur en élastine et l'accumulation de collagène compromet l'intégrité valvulaire, augmente la réponse inflammatoire et contribue à la rigidité de la valve aortique<sup>91</sup>.

### ii. Différenciation ostéoblastique

Un des mécanismes impliqués dans la pathogenèse du RAC est la différenciation des VICs en un sous-type de cellules « osteoblast-like » (obVICs). Ces cellules vont être capables de produire des dépôts calciques<sup>92</sup>. Les obVICs expriment des facteurs pro-ostéogéniques comme l'ostéopontine, l'ostéocalcine, l'alkaline phosphatase ou Runx2<sup>71</sup>. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la différenciation ostéogénique des VICs (figure 23) :

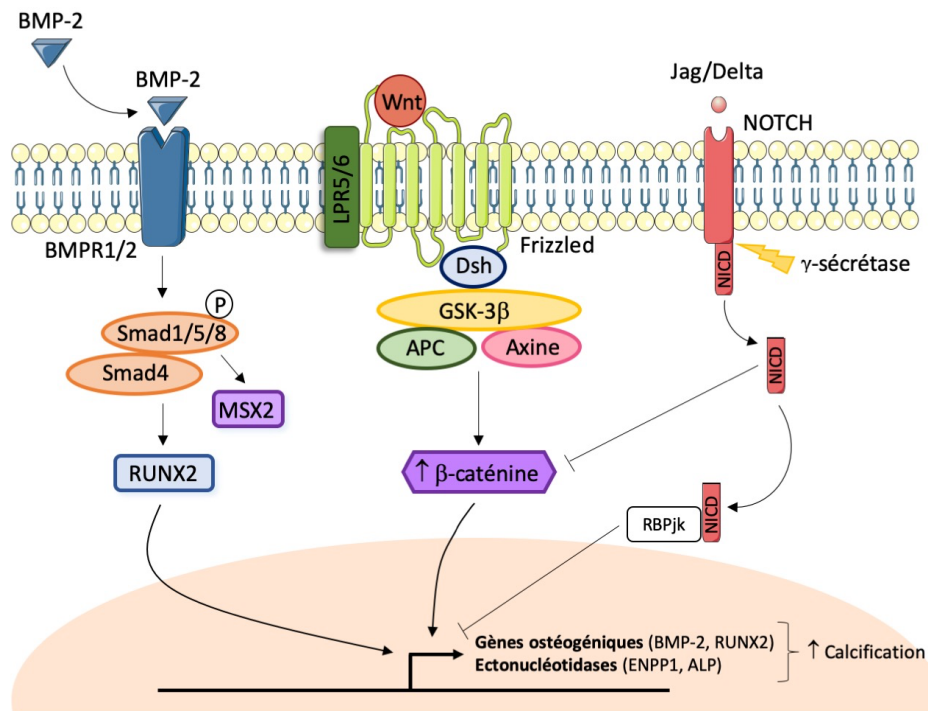
### ◇ BMP-2

BMP-2 est un marqueur de référence pour évaluer la différenciation ostéogénique des VICs. En effet, *Miller et coll.* ont montré que le BMP est augmenté dans le RAC et que son expression peut être augmentée par de nombreux stimuli comme les cytokines pro-inflammatoires ou les oxLDL<sup>75,93</sup>. Les BMP stimulent la calcification *via* l'activation de la voie de signalisation Smad et Wnt/ $\beta$ -caténine (*cf. paragraphe ci-dessous*) ainsi que l'expression du facteur de transcription Msx2 (*Msh homeobox 2*), un régulateur positif de la voie Wnt. L'activation de la voie des Smad

induit l'expression du facteur de transcription Runx2 qui va réguler l'expression des gènes de la calcification comme l'ostéopontine et l'ostéocalcine<sup>93</sup> (figure 24).

#### ◇ Wnt/ $\beta$ -caténine

L'activation de la voie de signalisation Wnt canonique est également responsable de la différenciation ostéoblastique des VICs. Le stress oxydatif contribue à la sécrétion du ligand Wnt3a qui va se fixer au complexe de récepteurs LPR5/6-*frizzled* (*low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6*), inactivant le complexe de séquestration de la  $\beta$ -caténine qui s'accumule dans le noyau pour induire l'expression des gènes de la calcification<sup>94,95</sup> (figure 24). Récemment, *Albanese et coll.* ont également montré l'implication des ligands de la voie Wnt non-canonique (Wnt5a, Wnt5b et Wnt11) où ils ont rapporté une augmentation de l'expression des ARNm dans les valves calcifiées<sup>96</sup>.



**Figure 24 : Voies de signalisation impliquées dans la différenciation des VICs.**

APC, adenomatous polyposis coli ; BMP-2, bone morphogenic protein 2 ; BMPR, BMP receptor ; Dsh, dishevelled ; GSK-3 $\beta$ , glycogen synthase kinase 3 $\beta$  ; LPR, low-density lipoprotein receptor-related protein ; MSX2, Msh homeobox 2 ; NCID, Notch intracellular domain ; RBPjk, recombining binding protein suppressor of the hairy family of repressors ; RUNX2, runt-related transcription factor 2 (*adapté de P. Mathieu et coll., Canadian J. of Cardiology, 2014*<sup>97</sup>)

#### ◇ Notch

La voie de signalisation Notch joue un rôle important dans la différenciation ostéoblastique des VICs. En effet, dans les conditions physiologiques, les ligands JAG 1-2 (jagged 1-2) et Delta 1-4 (*delta-like 1-4*) activent le récepteur NOTCH, le domaine intracellulaire de NOTCH

(NICD, *Notch intracellular domain*) subit un clivage protéolytique par la  $\gamma$ -sécrétase et est transloqué dans le noyau. NICD se lie à RBPjk (*recombining binding protein suppressor of the hairy family of repressors*), ce qui induit l'expression de HEY1 et HEY2 (*hairy repressors*) empêchant l'expression des gènes ostéogéniques et notamment Runx2<sup>40,97</sup> (figure 24). L'étude *in vitro* de Acharya et coll. a montré une diminution de l'expression de la forme clivée de NOTCH dans des valves aortiques sténosées et que l'inhibition de la voie de signalisation est associée à la calcification valvulaire<sup>98</sup>.

#### ◇ Angiotensine II

L'étude d'O'Brien et coll. a montré que l'angiotensine II (Ang II) est exprimée dans les valves sténosées et que ses effets pro-inflammatoires et pro-fibrotiques peuvent contribuer au processus de progression du RAC<sup>54</sup>. *In vitro* sur des cultures de VICs porcines, Xie et coll. ont démontré que l'angiotensine II serait capable d'induire la différenciation ostéoblastique des VICs *via* l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine<sup>99</sup>.

#### ◇ Le récepteur sensible au calcium (CaSR)

Le calcium extracellulaire est un messager important dans le système cardiovasculaire et est impliqué dans les processus de calcification *via* le récepteur sensible au calcium (CaSR). Il a été récemment reporté que l'activation de CaSR dans le système vasculaire réduisait la calcification des cellules musculaires lisses vasculaires<sup>100,101</sup>.

L'équipe d'Amiens a récemment montré que les VICs humaines expriment CaSR et que son expression est augmentée dans les valves aortiques de patients possédant un RAC. Dans des cultures de VICs, l'activation de CaSR induit la différenciation ostéogénique des VICs et la minéralisation de la valve aortique<sup>102</sup>. Ces données suggèrent que la modulation de l'activité de CaSR avec des agents pharmacologiques pourrait être une stratégie prometteuse pour prévenir la progression du RAC.

## 8. L'endothéline-1

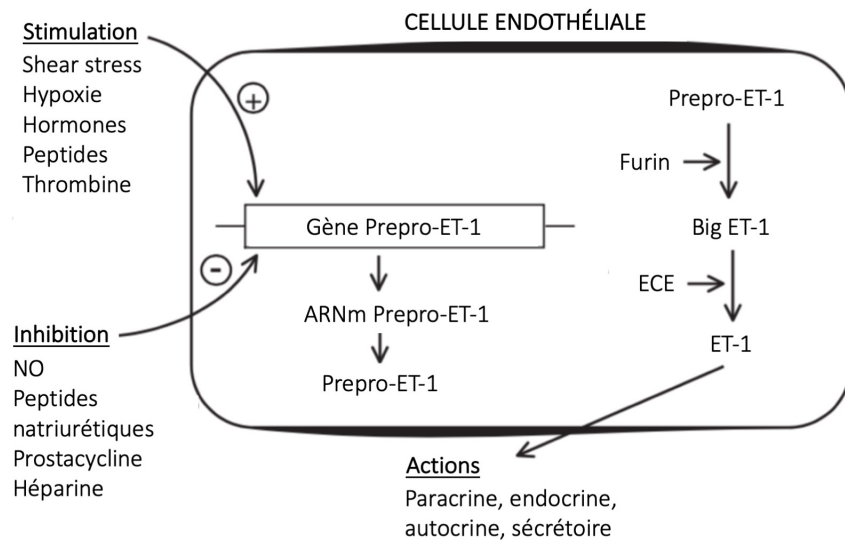
Comme décrit précédemment, le RAC est un processus activement régulé qui s'accompagne de changements dans l'expression de nombreux gènes, et notamment dans les gènes liés à l'endothéline<sup>103</sup>. Cependant, le rôle du système endothélinergique dans les processus de calcifications valvulaires reste peu décrit.

### a. Généralités

En 1985, *Hickey et coll.* ont décrit pour la première fois un peptide vasoconstricteur produit par les cellules endothéliales<sup>104</sup>. C'est l'équipe de *Yanagasiwa et coll.* qui l'ont ensuite isolé et identifié comme étant l'endothéline (ET), l'un des peptides vasoconstricteurs endogènes les plus puissants<sup>105</sup>. L'endothéline-1 est un isopeptide de 21 résidus acides aminés faisant partie de la famille des endothélines. Cette famille regroupe trois isoformes produits à partir de trois gènes différents appelés endothéline-1 (ET-1), endothéline-2 (ET-2) et endothéline-3 (ET-3)<sup>106,107</sup>. La production de l'ET-1 est régulée au niveau génique et implique des régulations moléculaires, chimiques et physiques (figure 25) et est activée dans de nombreuses situations pathologiques associées à une dysfonction endothéliale (figure 26).

### b. Synthèse de l'endothéline-1

L'ET-1 est en grande majorité synthétisée par les cellules endothéliales sous la forme d'un précurseur inactif de 212 résidus acides aminés appelé prépro-endothéline (prépro-ET). Un premier clivage par une protéase génère un intermédiaire biologiquement inactif, la big endothéline (Big ET), elle-même clivée par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) permettant la libération de la forme mature et active de l'ET<sup>106,108</sup> (figure 25).



**Figure 25 : Synthèse et régulation de l'endothéline.**  
(d'après F. Brunner et coll., *Pharmacology & Therapeutics*, 2006<sup>106</sup>)

### c. Les récepteurs à l'endothéline-1

L'ET active deux sous-types de récepteurs : le récepteur à l'ET de type A (ET<sub>A</sub>-R) et le récepteur à l'ET de type B (ET<sub>B</sub>-R). Les récepteurs à l'ET sont des protéines à sept domaines

transmembranaires couplées à des protéines G et sont présentes dans de nombreux tissus et cellules à différents niveaux d'expression.

Dans le système vasculaire, les deux sous-types de récepteurs sont retrouvés au niveau des cellules musculaires lisses (CML).  $ET_A$ -R et  $ET_B$ -R sont couplés à une protéine Gq qui active la phospholipase C (PLC) catalysant la dégradation du phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate (PIP2) en inositol(1,4,5)triphosphate ( $IP_3$ ) et diacylglycerol (DAG). L' $IP_3$  va se fixer sur le réticulum sarcoplasmique et entraîner l'augmentation du calcium cytosolique à l'origine de la vasoconstriction des vaisseaux<sup>106,107</sup>.

Cependant,  $ET_B$ -R est également présent sur les cellules endothéliales. La stimulation de  $ET_B$ -R de l'endothélium vasculaire va être responsable de la vasodilatation indirecte *via* l'action des composés vasodilatateurs sur les CML tels que le NO et la prostacycline<sup>107,109</sup>.  $ET_B$ -R est également responsable de la clairance de l'ET dans la circulation, permettant de maintenir des niveaux bas d'ET dans les tissus<sup>106,107</sup>.

Ces récepteurs peuvent être distingués pharmacologiquement en fonction de leur affinité pour les différents isoformes de l'ET. Ainsi, l' $ET_A$ -R est préférentiellement activé par l'ET-1 > ET-2 > ET-3, alors que l' $ET_B$ -R a une affinité similaire pour les trois isoformes<sup>107</sup>. Il est intéressant de savoir que les récepteurs à l'ET s'activent à des concentrations inférieures à  $10^{-9}M$ <sup>109</sup>.

#### d. Le système endothélinergique en conditions physiopathologiques

##### i. En conditions physiologiques

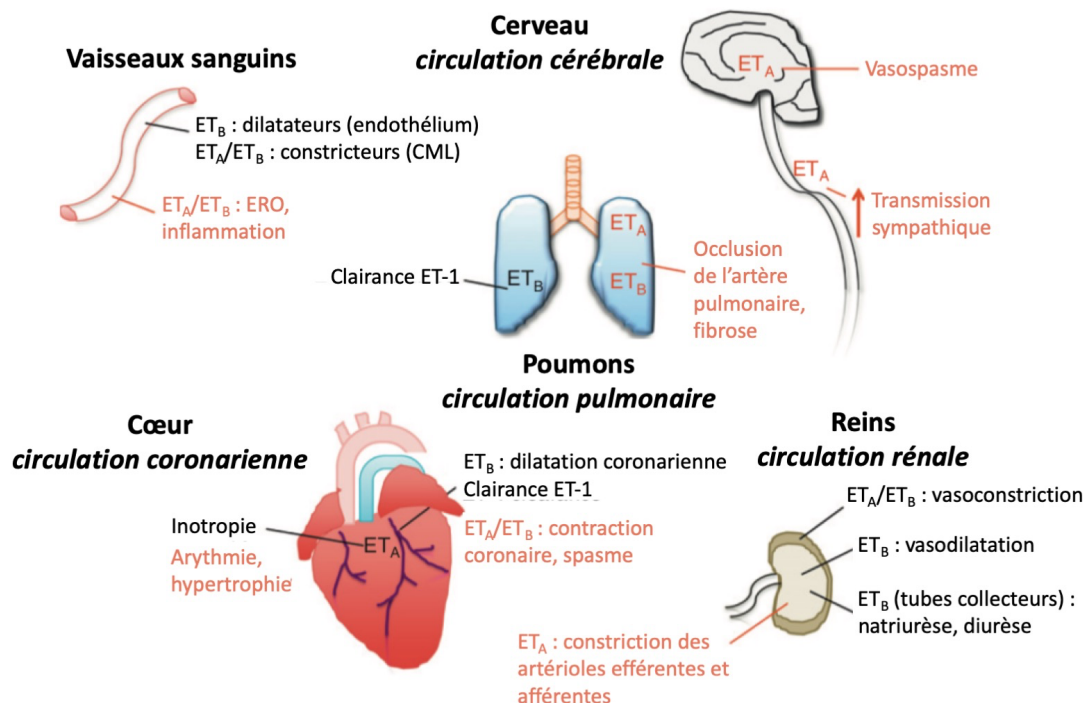
Le système endothélinergique est très finement régulé, principalement au niveau du gène codant pour la prépro-ET. En conditions physiologiques, la synthèse de l'ET et l'activité de ses récepteurs sont régulées positivement par de nombreux facteurs tels que la diminution du *shear stress*, l'hypoxie, les hormones, les peptides ou encore la thrombine. Au contraire, elle est inhibée par les facteurs dilatateurs endothéliaux comme le NO, les prostacyclines, les peptides natriurétiques et l'héparine<sup>106,108</sup> (figure 25).

Dans les conditions physiologiques, la voie de l'ET-1 est très peu activée et les concentrations plasmatiques en ET-1 sont très faibles, de l'ordre de 1 à 5 pM<sup>110</sup>. Cette concentration est très largement inférieure à la valeur seuil requise pour engendrer une vasoconstriction, soit 100 pM. Cependant, la concentration plasmatique n'est pas le réel reflet des concentrations tissulaires de l'ET-1, ni de l'activation de ses récepteurs<sup>111</sup>.

ii. *En conditions pathologiques*

De nombreuses pathologies sont associées à une augmentation des niveaux d'ET-1 circulants ; notamment l'insuffisance cardiaque, l'ischémie/reperfusion, l'hypertension et la fibrose pulmonaire. Dans ces situations pathologiques, le système endothélinergique est activé de manière générale avec non seulement une augmentation de la production de l'ET-1, mais également une augmentation de ses réponses biologiques<sup>105,109,112</sup> (figure 26).

L'activation du système endothélinergique s'accompagne le plus souvent d'une dysfonction endothéliale notamment caractérisée par une diminution de la biodisponibilité du NO et de la prostacycline. Ainsi, la dysfonction endothéliale est considérée comme un facteur responsable de l'augmentation des niveaux d'ET-1 circulants<sup>111</sup>. De plus, il a été montré que de nombreuses maladies associées à une dysfonction endothéliale sont également caractérisées par une diminution de la densité des récepteurs ET<sub>B</sub> induisant une diminution de la clairance de l'ET-1<sup>106,107</sup>. L'hypoxie et l'inflammation sont également des facteurs augmentant la synthèse d'ET-1 *via* la fixation de HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia inducible factor 1 alpha*) sur le promoteur du gène de l'ET (figure 25). L'augmentation d'ET-1 entraîne la suractivation de ses récepteurs et la vasoconstriction prolongée<sup>113</sup>.



**Figure 26** : Effets de l'endothéline-1 dans le système cardiovasculaire, en conditions physiologiques (*en noir*) et conditions pathologiques (*en rouge*) (CML, cellules musculaires lisses ; ERO : espèces réactives de l'oxygène). (*adapté de E. Thorin et coll., Advances in Pharmacology, 2010<sup>109</sup>*)



#### e. Le système endothélinergique dans les calcifications vasculaires et valvulaires

L'implication du système endothélinergique a également été décrite dans les calcifications vasculaires. *Wu et coll.* ont notamment montré *in vivo* et en culture qu'un antagoniste des récepteurs à l'ET-1 permet de diminuer les calcifications vasculaires induites par la nicotine et la vitamine D<sub>3</sub><sup>114</sup>.

*Peltonen et coll.* ont caractérisé l'expression du système endothélinergique dans la sténose aortique. Ils ont montré que l'ET-1 est exprimée dans la valve, et que l'expression des récepteurs ET<sub>A</sub> est augmentée dans les valves sténosées. L'expression des récepteurs ET<sub>B</sub> reste quant à elle inchangée<sup>103</sup>. Dans les travaux de *Berger-Klein et coll.* des concentrations plasmatiques élevées en Big ET-1 ont été retrouvées chez des patients atteints d'un rétrécissement aortique<sup>115</sup> ; cependant, dans l'étude de *Peltonen et coll.*, malgré la détection de cellules valvulaires positives à l'ET-1 en immunohistochimie dans les valves sténosées, les niveaux d'ARNm d'ET-1 restent inchangés, probablement dû au rôle des récepteurs ET<sub>B</sub> dans la clairance de l'ET-1<sup>103</sup>. Cette étude suggère l'implication du système endothélinergique dans le RAC avec une augmentation de l'expression de ET-1, et notamment de son récepteur de type A. Ces résultats permettent ainsi d'envisager l'antagonisme des récepteurs à l'ET-1 afin de réguler l'action de l'ET-1 et ainsi ralentir la progression du RAC.

#### f. Inhibition du système endothélinergique

Les études menées sur le système endothélinergique au cours de ces dernières années ont démontré son implication dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires. C'est pourquoi les recherches pharmacologiques visant à inhiber la synthèse, par inhibition de l'ECE-1 ; ou les effets biologiques de l'ET, par antagonisme mixte ou sélectif de ses récepteurs, se sont multipliées<sup>111</sup>.

Le bosentan, un antagoniste mixte des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> a été le premier traitement oral dans l'hypertension artérielle pulmonaire. Son efficacité a également été démontrée par sa capacité à réduire significativement les calcifications vasculaires *in vitro* dans des cultures de cellules musculaires lisses vasculaires de rats, mais également *in vivo* dans un modèle de calcification vasculaire chez le rat induit par l'administration de vitamine D<sub>3</sub> et de nicotine<sup>114</sup>.

Une étude a été menée dans le RAC avec un autre antagoniste mixte des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> : le tezosantan. *Leskelä et coll.* ont testé l'effet du tezosantan dans des cultures de valves aortiques humaines et ont constaté qu'il réduisait l'absorption de l'ET-1. Ces premiers résultats



suggèrent qu'un traitement pharmacologique par un antagoniste de l'endothéline pourrait être une voie prometteuse pour ralentir la calcification et la progression du RAC<sup>116</sup>.

Pour rappel, il n'existe à ce jour aucun traitement pharmacologique permettant de ralentir ou de stopper la progression du RAC. Jusqu'à présent, les traitements avec les statines ou les inhibiteurs du système rénine-angiotensine ont été les principaux médicaments étudiés dans la sténose aortique, cependant aucune de ces molécules n'a prouvé son efficacité dans le traitement du RAC<sup>50,52,53,56</sup>.

### III- LES MODÈLES ANIMAUX EXPÉRIMENTAUX

Les modèles animaux sont importants pour étudier la physiopathologie, l'initiation et la progression des pathologies pour permettre de juger de l'efficacité des interventions thérapeutiques. Pour cela, les modèles *in vivo* se doivent d'être fiables et reproductibles, et de mimer la maladie humaine. Il est important de souligner que la sténose aortique humaine est un processus dégénératif lent, restant longtemps asymptomatique et prenant des années avant de s'exprimer sur le plan clinique. Or, nous attendons d'un modèle animal une cinétique rapide, de l'ordre de quelques semaines. À l'heure actuelle, les espèces animales les plus utilisées pour modéliser le rétrécissement aortique sont : le porc, le lapin, le rat et la souris. Néanmoins, l'élaboration d'un modèle animal reproduisant le RAC reste complexe.

#### 1. Le porc

Le porc présente de nombreuses similitudes avec l'homme, notamment concernant l'anatomie du cœur et des valves ainsi que pour les variables hémodynamiques<sup>117</sup>. Le porc développe naturellement des lésions athéroscléreuses qui peuvent être accélérées par un régime hypercholestérolémiant. Le porc représente ainsi un excellent modèle pour les recherches sur l'athérosclérose et plus récemment pour le RAC<sup>118</sup>.

Le porc est le seul modèle animal capable de développer spontanément un RAC avec l'âge qui peut être également accéléré avec un régime alimentaire riche en cholestérol. Les études menées sur le porc ont montré que les animaux nourris avec un régime hypercholestérolémiant développent une maladie de type humaine. Les valves présentent des signes de fibrose ainsi qu'une infiltration lipidique qui reste minime. Des petits nodules calciques sont également observés après six mois de régime<sup>117</sup>. *Simmons et coll.* et *Guerraty et coll.* ont également mis en évidence que la sténose valvulaire se développe préférentiellement sur le versant aortique des feuillets valvulaires et qu'elle est associée à une régulation endothéliale dépendante de l'eNOS<sup>117,119</sup>. Cependant, le RAC chez le porc reste principalement fibreux avec peu de calcifications. De plus, les contraintes liées à l'étude de cet animal en termes d'infrastructure et d'apparition tardive des lésions rendent ce modèle difficile à étudier.

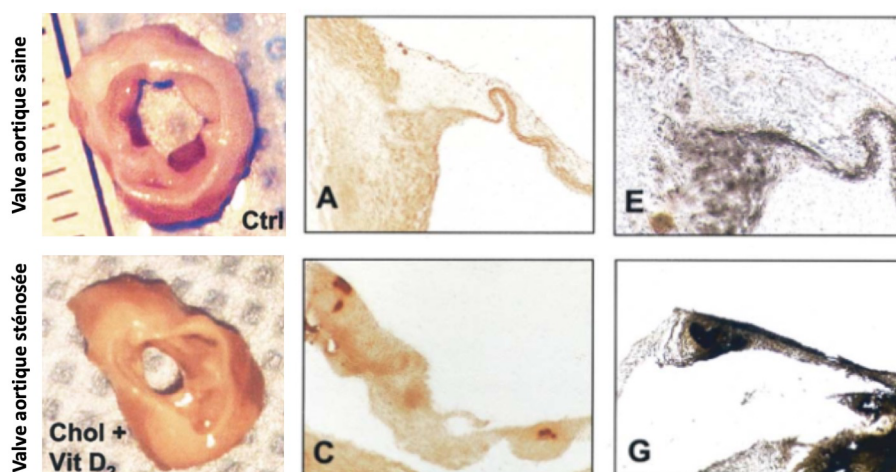
#### 2. Le lapin

Le lapin ne développe pas naturellement de maladie valvulaire aortique mais est cependant sensible à un régime hypercholestérolémiant. Les premières études menées chez le lapin blanc de Nouvelle-Zélande (NZWR, *New Zealand white rabbit*) ont révélé des changements de

l'endothélium valvulaire aortique lorsque les animaux sont soumis à un régime enrichi en cholestérol<sup>120</sup>. Depuis, le lapin est devenu un modèle répandu pour l'étude du RAC lié à l'hypercholestérolémie. Un régime alimentaire enrichi en cholestérol de plusieurs semaines entraîne chez cet animal l'accumulation de LDL sous l'endothélium valvulaire qui s'associe avec le collagène de la MEC.

*Rajamannan et coll.* ont étudié ce modèle et ont montré que les lésions athéroscléroseuses valvulaires étaient associées à des processus inflammatoires et prolifératifs ainsi qu'à l'expression génique de marqueurs ostéoblastiques pouvant cependant être inhibés par l'atorvastatine<sup>121</sup>. Une néo-angiogenèse a également été décrite dans ce modèle et a été quantifiée par IRM à l'aide de nano-particules<sup>122</sup>.

*Drolet et coll.* ont décrit qu'un régime hypercholestérolémiant seul ne pouvait induire de sténose aortique chez le lapin NZWR, mais seulement des lésions dites « athéroscléroseuses ». Cependant, associé à une hypercalcémie induite par la vitamine D<sub>2</sub>, les auteurs ont décrit des lésions histologiques et une augmentation du gradient transvalvulaire en échographie. Le régime enrichi en cholestérol combiné à des injections de vitamine D<sub>2</sub> engendre un épaissement et des dépôts calciques sur les feuillets valvulaires associé à une réduction de l'orifice d'ouverture de la valve aortique et une augmentation des gradients transvalvulaires aortiques<sup>123</sup> (figure 27). Néanmoins, ce modèle a été remis en cause par *Hekimian et coll.*, car ils n'ont détecté aucunes calcifications de la valve aortique ni de changements dans les paramètres hémodynamiques<sup>124</sup>.



**Figure 27** : Valve aortique sténosée chez le lapin NZWR. Photographie d'une valve aortique d'un lapin nourri avec un régime hypercholestérolémiant et enrichi en vitamine D<sub>2</sub>. Dépôts calciques visualisés par coloration au rouge alizarine (A, C) ou au Von Kossa (E, G), dans une valve aortique normale (A, E) ou sténosée (C, G).  
(adapté de MC. Drolet et coll., *J. of the Am. Coll. of Cardiology*, 2003<sup>123</sup>)

### 3. La souris

La souris est le modèle animal le plus utilisé pour l'expérimentation animale et notamment pour l'étude du RAC. Leur gestion est plus facile et moins coûteuse, et il existe une importante disponibilité de souches mutées. Les souris sauvages (WT, *wild type*) ne développent pas spontanément de RAC, et par conséquent les études chez cet animal nécessitent des modifications génétiques et/ou des interventions alimentaires ou autres afin d'induire la maladie.

Il est intéressant de savoir que la principale souche utilisée dans les modèles de RAC est la souche C57BL/6J, qui est par ailleurs la souche la plus sujette à l'athérosclérose. Cependant, il est important de savoir que les valves des souris C57BL/6J contiennent des mélanocytes ou des granules de lipofuscine qui pigmentent la valve en noire et il est donc possible de confondre cette pigmentation avec la calcification quand une coloration Von-Kossa est utilisée<sup>125</sup>.

#### a. Modèles dyslipidémiques

*Weiss et coll.*, ont montré une sténose aortique chez des souris hypercholestérolémiques âgées de 20 mois, déficientes pour le récepteur au LDL cholestérol et exprimant uniquement l'apolipoprotéine B 100 humaine (*LDLr<sup>-/-</sup> ApoB<sup>100/100</sup>*). Chez ces souris, la maladie valvulaire est accompagnée d'une hypertrophie ventriculaire gauche et d'une baisse de la fraction d'éjection qui sont les signes cliniques d'un RAC sévère. Il s'agit du premier modèle de sténose aortique qui développe non seulement les effets hémodynamiques de la sténose aortique, mais également la maladie cardiaque (hypertrophie ventriculaire gauche) induite par le RAC<sup>126</sup>. *Matsumoto et coll.* ont par ailleurs montré dans ce modèle qu'une activité physique régulière préservait l'intégrité de l'endothélium valvulaire et augmentait la biodisponibilité du NO, réduisait l'inflammation et le stress oxydatif et inhibait la différenciation ostéogénique<sup>127</sup>.

Une étude menée par *Miller et coll.* a montré que chez des souris *reversa LDLr<sup>-/-</sup> ApoB<sup>100/100</sup> Mtp<sup>fl/fl</sup>* présentant un RAC précoce, la réduction des taux plasmatiques de lipides par inactivation du gène *Mtp* permet de réduire le stress oxydatif, la signalisation pro-ostéogénique et ainsi l'arrêt de la progression de la sténose aortique<sup>128</sup>. Ces résultats ont été confirmés chez des souris présentant une sténose aortique plus avancée, cependant la fonction valvulaire n'a pu être améliorée<sup>129</sup>. Ces études confirment ainsi l'importance des taux plasmatiques en lipides dans la pathologie du RAC.

Ces modèles dyslipidémiques ont contribué à développer les connaissances initiales sur le RAC, cependant il faut souvent attendre plus de vingt mois avant que ces souris développent un RAC sévère. De plus, tous les animaux ne développent pas de sténose aortique hémodynamique significative et cette sténose est parfois associée à une insuffisance aortique, souvent négligée.

#### b. Régimes alimentaires hypercholestérolémiants et hyperglycémiant

Les nombreuses études menées sur le RAC suggèrent un lien entre la sténose aortique et l'athérosclérose. C'est pourquoi dans de nombreux modèles la sténose aortique est induite par une hypercholestérolémie extrême.

*Tanaka et coll.* ont étudié le rôle des lipides dans un modèle de souris déficientes en apolipoprotéine E (*ApoE*<sup>-/-</sup>) âgées de 30 mois. Sans intervention alimentaire, les souris *ApoE*<sup>-/-</sup> développent une hypercholestérolémie, une inflammation et des calcifications associées à une augmentation du gradient transvalvulaire aortique<sup>130</sup>. L'administration d'une alimentation enrichie en graisses chez ces mêmes souris pendant une durée de 5 mois provoque une accélération du développement de la sténose aortique, un épaissement des feuillets valvulaires ainsi que des lésions endothéliales accompagnées de processus inflammatoires. Cependant la calcification reste minime dans ce modèle et la sévérité des RAC est extrêmement variable<sup>131</sup>.

Contrairement aux précédentes études, *Drolet et coll.* ont évalué l'effet d'un régime alimentaire riche en gras et en glucides (HF/HC, *high-fat/high-carbohydrate*) sans cholestérol ajouté chez des souris WT C57BL6/J et *LDLr*<sup>-/-</sup>. Les animaux soumis au régime alimentaire HF/HC sont devenus légèrement hypercholestérolémiques et hyperglycémiques, et présentaient une aire valvulaire diminuée ainsi que des gradients transaortiques augmentés, entraînant ainsi des anomalies valvulaires<sup>132</sup>. Cette étude suggère que la sténose aortique est multifactorielle et que l'hypercholestérolémie n'est pas la seule cible dans cette pathologie.

#### c. Les autres modèles génétiquement modifiés

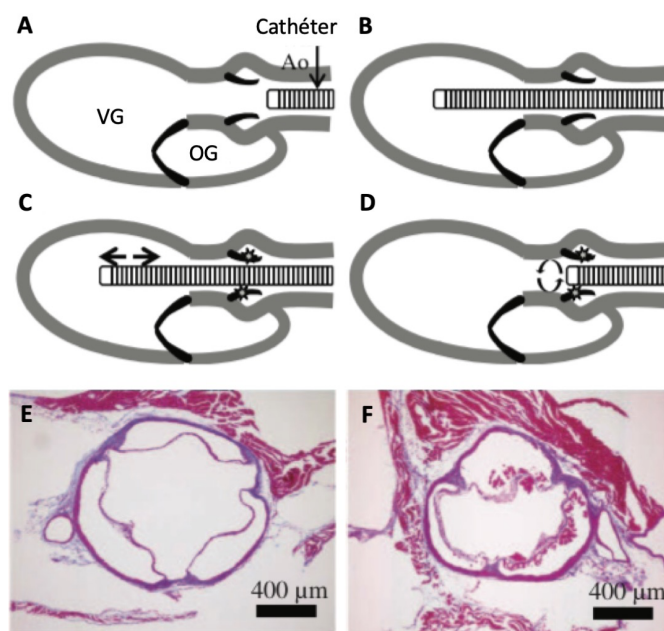
*Lee et coll.* ont montré que des souris déficientes pour la *eNOS* (*eNOS*<sup>-/-</sup>) sont prédisposées à développer une valve aortique bicuspidie. Cependant, bien que la bicuspidie aortique soit une des prédispositions cliniques majeures au développement du RAC, dans cette étude, aucun des animaux n'a développé de sténose aortique<sup>133</sup>. Le travail de *El Accaoui et coll.* a montré que les souris *eNOS*<sup>-/-</sup> présentaient également un épaissement des feuillets valvulaires, des dépôts

lipidiques ainsi que des calcifications. Cependant ces atteintes valvulaires ne provoquent qu'une modeste élévation des gradients transvalvulaires aortiques<sup>134</sup>.

D'autres études ont montré que des mutations de *Notch1* sont également impliquées dans la bicuspidie aortique chez l'homme<sup>40</sup> et que chez la souris cette délétion est associée au développement d'une sténose aortique, avec une augmentation des facteurs de transcription de la calcification, et ce, notamment lorsque les animaux sont alimentés avec un régime hypercholestérolémiant<sup>40,135</sup>.

#### d. Lésions mécaniques de la valve

Plus récemment, des modèles de sténose aortique basés sur des lésions mécaniques de la valve ont été développés. Brièvement, sous échocardiographie un cathéter est introduit dans l'aorte ascendante puis inséré dans le VG. Le traumatisme valvulaire est provoqué par des allers et retours et des rotations d'un cathéter à travers l'orifice valvulaire provoquant l'abrasion du tissu endothélial (figure 28). Cette technique chirurgicale permet d'engendrer 100% de sténose aortique dans les 16 semaines suivant l'intervention et est associée à environ 20% de mortalité. Cependant, la lésion mécanique entraîne une altération des VECs ne permettant pas d'étudier les mécanismes de la dysfonction endothéliale ou d'envisager une stratégie thérapeutique de protection endothéliale<sup>136</sup>. D'autre part, ce modèle est complexe et nécessite une expertise à la microchirurgie et peut également engendrer des insuffisances aortiques.

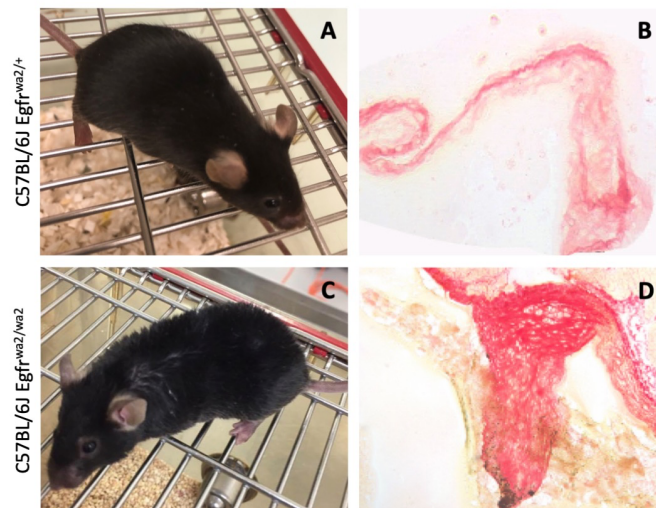


**Figure 28 : Modèle de lésion mécanique de la valve aortique.** Introduction du cathéter dans l'aorte ascendante (A) puis dans le ventricule gauche (B). Lésions de la valve aortique par allers et retours (C) et rotation d'un cathéter (D). Coloration histologique au trichrome de Masson dans une valve contrôlée (E) et une valve lésée (F).  
(adapté de S. Honda et coll., *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2014<sup>136</sup>)

#### 4. Le modèle *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>*

Des études menées chez la souris ont montré le rôle du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) dans le développement valvulaire<sup>137</sup>. La mutation hypomorphe *Egfr<sup>Wa2</sup>* consiste en la substitution du résidu aminé glycine par une valine en position 743 dans le troisième sous-domaine de la protéine, soit proche de l'activité tyrosine kinase de la protéine. Les souris *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* homozygotes pour la mutation voient leur activité tyrosine kinase diminuée de 90%. Ces souris sont reconnaissables par leur phénotype particulier au pelage ondulé, et présentent un épaissement des feuillets valvulaires (figure 29). En revanche, les souris *Egfr<sup>-/-</sup>* présentent de graves anomalies avec un fort taux de létalité *in utero*<sup>138</sup>.

En 2009, *Barrick et coll.* ont proposé le modèle de souris *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* comme un modèle de rétrécissement aortique. L'étude princeps de ce modèle a permis de montrer des gradients transaortiques élevés associés à un remaniement valvulaire avec un épaissement des feuillets aortiques, un infiltrat inflammatoire et une augmentation de la calcification<sup>139</sup>. Cependant *Hajj et coll.* ont rapporté en 2015 que le modèle de souris *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* reste un modèle peu calcifié et s'exprime essentiellement sous la forme d'une insuffisance aortique prédominante. L'augmentation du débit cardiaque induite par l'insuffisance aortique est en réalité la principale explication de l'élévation des gradients transaortiques sans rétrécissement aortique significatif<sup>140</sup>.



**Figure 29** : Le modèle de souris *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>*. Souris C57BL/6J hétérozygotes *Egfr<sup>Wa2/+</sup>* (A, B) et homozygotes *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* (C, D). Coloration au rouge sirius d'une valve aortique normale (B) et fibrosée (D).



## *Objectifs de la thèse*

Le rétrécissement aortique calcifié (RAC) représente un important problème de santé publique en raison du vieillissement de la population et on estime que sa prévalence augmentera considérablement au cours des prochaines décennies. Son évolution est généralement lente et il n'existe actuellement aucun traitement permettant de prévenir ou ralentir sa progression en raison de sa physiopathologie complexe et encore incomplètement élucidée<sup>22,30</sup>. D'autre part, afin d'évaluer de nouvelles cibles thérapeutiques, il est indispensable d'avoir un modèle animal fiable et reproductible de la pathologie humaine. Actuellement, il est habituel de considérer qu'il n'y a pas de modèle animal fiable.

Les deux principaux objectifs de ce travail portent donc d'une part sur l'évaluation d'un modèle animal déjà publié mais modulé par un régime enrichi en cholestérol et une supplémentation en vitamine D<sub>3</sub> ; et d'autre part sur l'impact du système endothélinergique sur la calcification valvulaire aortique.

Ce travail a été possible grâce à l'obtention d'une bourse doctorale au sein de la FHU REMOD-VHF [« Early marker of cardiovascular REMODEling in Valvulopathy and Heart Failure » du G4 (Amiens, Caen, Lille et Rouen), coordonnée par le Pr. Hélène Eltchaninoff, chef du service de cardiologie du CHU Charles Nicolle de Rouen]. Notre FHU a par ailleurs été lauréat d'un RHU intitulé STOP-AS « Search Treatment and improve Outcome of Patients with Aortic Stenosis » et ces deux volets font partie du workpackage 2 du projet STOP-AS.





CHAPITRE II  
*Matériels & Méthodes*

---



# I- MODÈLES EXPÉRIMENTAUX ET TECHNIQUES DE GÉNOTYPAGE

## 1. Animaux utilisés

### a. Expérimentation animale

Les expérimentations animales ont été réalisées en accord avec les directives de l'Institut National de la Santé. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique régional de l'Université de Rouen Normandie, conformément à la législation française et européenne (APAFIS#9108-2017030215075973). L'ensemble des animaux a été maintenu dans des conditions standards avec un cycle jour/nuit de 12 heures à une température de  $22\pm 1^\circ\text{C}$ , avec un accès libre à l'eau et à la nourriture.

### b. Souris sauvages

Les expérimentations animales effectuées sur des animaux sauvages étaient des souris mâles âgées de 8 semaines (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France). Les souris sauvages, appelées *Wild Type* (WT), de fond génétique C57BL/6J ont été utilisées pour l'étude préliminaire de la mise au point de la voie et de la dose d'administration de la supplémentation en vitamine D<sub>3</sub>.

### c. Souris génétiquement modifiées pour le récepteur à l'EGFR

Les souris hétérozygotes C56BL/6J  $Egfr^{Wa2/+}$  ont été obtenues auprès du Laboratoire Jackson (lignée SN 317, Bar Harbor, Maine, États-Unis). Les souris homozygotes  $Egfr^{Wa2/Wa2}$  étant moins fertiles que les souris hétérozygotes  $Egfr^{Wa2/+}$ , exclusivement les animaux  $Egfr^{Wa2/+}$  ont été utilisés pour la reproduction pour obtenir des souris homozygotes  $Egfr^{Wa2/Wa2}$ . Les nouveaux nés homozygotes  $Egfr^{Wa2/Wa2}$  ont été identifiés par leur phénotype à poils frisés (*wave mice*). Le phénotype a ensuite été confirmé par PCR.

## 2. Génotypage des animaux

### a. Biopsie des tissus

La biopsie des queues de souris pour le génotypage des animaux a été réalisée chez des souriceaux âgés d'environ 10 jours après anesthésie locale par immersion de la queue dans de l'éthanol glacé pendant 10 secondes. Un échantillon de queue d'environ 2 à 5mm ( $\pm 20$  à 50mg) était ensuite coupé à l'aide d'une paire de ciseaux stérilisés à l'éthanol 70%, puis transféré dans un tube pour l'extraction d'ADN génomique.

### b. Extraction de l'ADN génomique

La biopsie de queue a été digérée dans un tube contenant 400µL de tampon de lyse (100mM Tris HCl pH8,8 ; 5mM EDTA pH8 ; 0,2% SDS ; 200mM NaCl) et 4µL de protéinase K 10 mg/mL (Sigma-Aldrich). L'échantillon a été incubé une nuit à +55°C jusqu'à ce que le tissu soit dissout. Après incubation, l'échantillon était brièvement vortexé puis centrifugé à 14 000g pendant 10 minutes à température ambiante pour concentrer les débris au fond du tube. Au moins 200µL de surnageant était transféré dans un nouveau tube puis complété avec le même volume d'isopropanol (v/v) (Thermoscientific). Le tube était mélangé doucement sur un agitateur planaire pour voir apparaître les méduses d'ADN. L'échantillon était ensuite de nouveau centrifugé à 14 000g pendant 15 minutes à +4°C. Le surnageant était enlevé et le culot contenant l'ADN génomique était lavé avec 500µL d'éthanol 70% (Thermoscientific). L'échantillon était centrifugé à 14 000g pendant 5 minutes à +4°C, puis de nouveau lavé à l'éthanol 70%. L'échantillon était séché à l'air libre pendant environ 1 heure sous une hotte chimique. Le culot d'ADN était resuspendu dans 50 à 200µL d'eau nucléase free (Thermoscientific). La qualité et la quantité d'ADN de l'échantillon ont été évaluées par dosage au Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermoscientific). L'ADN était conservé à +4°C jusqu'à réalisation des PCR.

### c. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les PCR ont été réalisées à partir de l'ADN génomique préalablement extrait. Les PCR ont été effectuées sur une plaque 96 puits (0,2mL Non-skirted Low Profile 96-well PCR plate + Optically clear flat 8 Cap strips, Thermoscientific) et déposées sur un pain de glace (PCR cooler, Eppendorf) permettant de maintenir les puits à +4°C. Pour 5µL d'ADN génomique (100 ng/µL), 20µL d'un mix PCR a été préparé de la façon suivante :

- 2,5µL 5X Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega)
- 2,5µL MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega)
- 0,5µL dNTP 10mM (Promega)
- 0,5µL d'amorce sens 10µM
- 0,5µL d'amorce anti-sens 10µM
- 0,25µL de Taq Polymerase 5U/µL (Promega)
- 13,25µL d'eau RNase Free

La séquence des amorces PCR a été synthétisée par le laboratoire Sigma-Aldrich et répertoriée dans le tableau 2.

Lignée	Amorce	Séquences 5'→3'
<i>Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup></i>	Sens	AAAGGGATATGCGTGCCTCT
	Anti-sens	TGCACACACCAGTTGAGGAG

**Tableau 2** : Séquences d'amorces PCR pour le génotypage.

L'amplification a été réalisée avec un thermocycler programmable (Mastercycler® Family, Eppendorf) selon la programmation référence dans le tableau 3.

Dénaturation	Amplification			Élongation	Diminution T°C
95°C, 3min	34 cycles			72°C, 10min	4°C, ∞
	Dénaturation 95°C, 15s	Hybridation 61°C, 30s	Élongation 72°C, 30s		

**Tableau 3** : Condition de programmation des PCR pour le génotypage.

Suite à la PCR, un fragment de 230 paires de bases était amplifié, puis est mis en digestion par l'enzyme de restriction Fast Digest Fok I (Thermoscientific). Pour 10µL de produit PCR, 20µL d'un mix de digestion était préparé de la façon suivante :

- 2µL 5X Fast Digest Green Buffer (Promega)
- 1µL Fast Digest Fok I
- 17µL d'eau RNase Free

Cette enzyme de restriction digère spécifiquement la séquence 5'...CGATG...3' 3'...CCTAC...5' (10 minutes à 37°C, puis 5 minutes à 65°C).

#### d. Migration et révélation

Le produit de digestion était déposé sur un gel d'agarose 2% (Sigma) contenant 1/10000<sup>ème</sup> d'un intercalant de l'ADN (Safe View™ Classic, ABM). Le gel était déposé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon Tris-Acetate-EDTA 1X (TAE 50X Solution, Thermoscientific). Cinq microlitres du marqueur de taille (Ladder Trackit™ 1Kb, Sigma) était déposé dans le premier puits. Cinq microlitres de produit de digestion était déposé dans chacun des autres puits du gel d'agarose. La migration a été réalisée du pôle négatif vers le pôle positif

à 35 Volts pendant 30 minutes. La révélation des bandes a été effectuée sous une lampe à ultraviolets, puis une photo de gel était imprimée. Les souris *Egfr*<sup>Wa2/Wa2</sup>, homozygotes pour la mutation, présentent deux bandes à 100 et 130pb. Les souris indemnes de la mutation ne présentent pas de fragment digéré, une bande unique de 230pb est observée. Les souris *Egfr*<sup>Wa2/+</sup> possèdent quant à elles les trois bandes à 100, 130 et 230pb. Les animaux ont ainsi été triés en fonction du génotype afin d'isoler les souris homozygotes pour la mutation.

## II-SUPPLÉMENTATION EN VITAMINE D<sub>3</sub> ET RÉGIME HYPERCHOLESTÉROLÉMIANT

### 1. Optimisation chez les souris C57BL6/J

#### a. Choix de la dose optimale de vitamine D<sub>3</sub> et de la voie d'administration

La vitamine D<sub>3</sub> (Supelco Cholecalciferol (D<sub>3</sub>), 100mg, Sigma-Aldrich) a d'abord été dissoute dans 10mL d'éthanol 100% pour obtenir une solution mère à 10 mg/mL. La solution mère était ensuite diluée dans 0,02% de Tween 80 en fonction des différentes doses de vitamine D<sub>3</sub> à administrer aux animaux (tableau 4). Les solutions injectables ont été refaites avant chaque administration et le volume d'injection ajusté en fonction du poids de chaque souris.

Des souris mâles WT C57BL6/J (n=35) sont utilisées pour définir la voie d'administration et la dose optimale de vitamine D<sub>3</sub> à administrer. Les souris sont réparties en six groupes de chacun cinq animaux en fonction de la voie et de la dose choisie (« faible » ou « forte »). Un groupe contrôle ne recevant aucune injection a également été réalisé. L'ensemble des doses testées sont indiquées dans le tableau 4. Chaque groupe a bénéficié de la supplémentation vitaminique trois fois par semaine sur une durée de quatre semaines.

Voie d'administration	« Faible dose » de vitamine D <sub>3</sub> HFD SAFE U8951	« Forte dose » de vitamine D <sub>3</sub> HFD Diet D12451
Intrapéritonéale	2 000 UI/g	4 000 UI/g
Sous-cutanée	16 000 UI/g	24 000 UI/g
Gavage	20 000 000 UI/g	40 000 000 UI/g
Contrôle	Pas de supplémentation vitaminique, nourriture standard	

**Tableau 4** : Mise au point de la dose d'injection en vitamine D<sub>3</sub>, de la voie d'administration et du régime hypercholestérolémiant.

#### b. Régime hypercholestérolémiant

Deux régimes hypercholestérolémiants ont été testés en parallèle de la vitamine D<sub>3</sub>. Les animaux ont été séparés en deux groupes. Les souris injectées avec une faible dose de vitamine D<sub>3</sub> (n=15) suivaient un régime high fat (HF) à 4,5% de cholestérol (SAFE U8951, Safe Diet),

et les souris injectées avec une forte dose de vitamine D<sub>3</sub> (n=15) suivaient un régime HF avec 0,5% de cholestérol (Diet D12451, Research Diets) (tableau 4). Le groupe contrôle (n=5) était alimenté avec une nourriture standard (SAFE A03, Safe Diets). La nourriture distribuée a été pesée pour chaque cage afin d'évaluer la consommation des souris. Au bout de quatre semaines, les animaux ont été sacrifiés pour l'analyse du sérum sanguin.

## 2. Étude chez les souris *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>*

Des souris mâles et femelles *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* âgées de 6 semaines ont été injectées trois fois par semaine en sous-cutanée avec une solution de vitamine D<sub>3</sub> à 16 000 UI/g et ont été nourries avec un régime enrichi en cholestérol (SAFE U8951) jusqu'à l'âge de 6 mois (n=16). Des souris injectées avec une solution placebo et nourries avec une nourriture standard ont été utilisées comme groupe contrôle (n=12).

En supplément, pour évaluer l'effet à long terme, des souris *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* bénéficiaient de la supplémentation vitaminique et du régime HF jusqu'à l'âge de 9 mois (n=11). L'aspect général de la souris était vérifié et le poids mesuré avant chaque injection. La prise alimentaire était aussi calculée pour chaque cage.

# III- ÉVALUATION DE LA FONCTION CARDIAQUE ET VALVULAIRE

## 1. Échocardiographie

Les mesures échocardiographiques ont été réalisées à l'âge de 3, 6 et 9 mois sur un échographe Vivid7 Ultrasound (General Electric Healthcare, Chicago, Illinois, États-Unis). L'échographe est équipé d'une sonde linéaire de 14 MHz (M12L) pour les acquisitions morphologiques, et d'une sonde pédiatrique 10S pour les acquisitions doppler. L'analyse des images a été réalisée avec le logiciel Echopac PC (General Electric Healthcare).

## 2. Préparation des animaux

Pour procéder à l'échocardiographie, les souris ont d'abord été anesthésiées par de l'isoflurane 1% (ISO-VET Piramal Healthcare) en cage à induction, puis tondues au niveau de l'hémithorax gauche. Les souris étaient ensuite placées sur plaque chauffante à 37°C pour éviter l'hypothermie. Les souris étaient maintenues sous anesthésie générale par inhalation d'isoflurane 2% pendant toute la durée de l'acquisition. La concentration en isoflurane a été



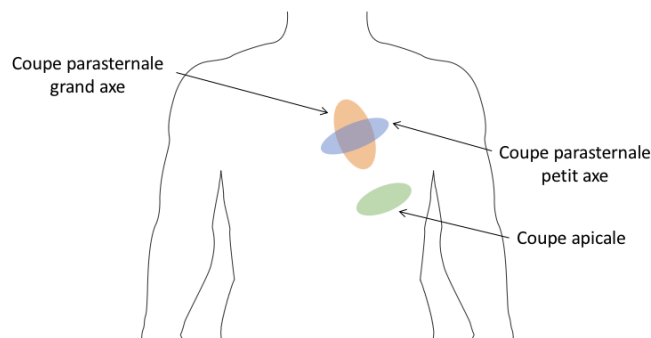
adaptée si besoin afin de garder une fréquence cardiaque supérieure à 400 battements/minute tout en permettant une sédation suffisante.

### 3. Fonction cardiaque

#### a. Temps-Mouvement

L'acquisition des mesures en mode temps-mouvement a été réalisée en coupe parasternale petit axe passant par les piliers de la valve mitrale (figure 30). Les épaisseurs des parois antérieure et postérieure (mm), ainsi que les diamètres (mm) du ventricule gauche (VG) ont été mesurés en télésystole (DtSVG) et en télédiastole (DtDVG) afin de calculer la fraction de raccourcissement (FR), paramètre reflétant la fonction contractile du VG.

$$FR (\%) = \frac{DtDVG - DtSVG}{DtDVG} \times 100$$



**Figure 30** : Représentation schématique des différentes coupes échocardiographiques.

#### b. Analyse doppler

L'analyse doppler en mode pulsé permet de visualiser et de mesurer les vitesses de déplacement des flux sanguins au sein des cavités cardiaques et des vaisseaux. La sonde était placée au niveau de l'aorte thoracique pour visualiser le flux sanguin sortant du VG. Les mesures de la fréquence cardiaque (FC, battements/minute) et de l'intégrale temps-vitesse (ITV, cm) permettent de calculer le volume d'éjection systolique (VES, mL) qui représente la capacité du VG à éjecter le sang vers le système périphérique :

$$VES = ITV \text{ aortique} \times \pi \times \left( \frac{D^2 \text{ aortique}}{4} \right)$$

Le débit cardiaque (DC mL/minute) a été calculé de la façon suivante :

$$DC = VES \times FC$$

## 4. Fonction valvulaire aortique

### a. Temps-Mouvement

La mesure du diamètre de la chambre de chasse ventriculaire gauche (dCCVG, cm) et de l'écart intersigmoïdien (cm) ont été évalués en mode temps-mouvement en coupe parasternale grand axe (figure 30).

### b. Analyse doppler

L'analyse en doppler continu en couple apicale a permis de mesurer le gradient moyen (AoGmax, mmHg), le jet de vélocité maximale (AoVmax, m/s) et l'intégrale temps-vitesse transaortique (ITV<sub>Ao</sub>, m/s). L'analyse en doppler pulsé a permis de mesurer l'ITV sous aortique au niveau de la chambre de chasse du ventricule gauche (ITV<sub>CCVG</sub>, m/s). La surface valvulaire aortique (SVAo, cm<sup>2</sup>) a été mesurée par l'équation de continuité :

$$SVAo = \frac{\pi \times d_{CCVG}^2 \times ITV_{CCVG}}{4 \times ITV_{Ao}}$$

L'existence d'une insuffisance aortique (IA) a été visualisée en doppler couleur et continu. La sévérité de l'IA a été évaluée selon la mesure du diamètre de la vena contracta (cm).

## IV- DOSAGES BIOCHIMIQUES

### 1. Prélèvement du sérum sanguin

Les souris ont été anesthésiées par un mélange de xylazine (10 mg/kg) et de kétamine (100 mg/kg). Après incision au niveau de l'abdomen, un prélèvement sanguin a été effectué par ponction de la veine cave inférieure avec une seringue héparinée. Le sérum sanguin a été obtenu par coagulation du sang total à température ambiante puis par centrifugation à 6000g pendant 15 minutes. Le sérum a été récupéré et plongé dans l'azote liquide avant d'être congelé à -80°C.

### 2. Dosage sérique

Les dosages biochimiques ont été effectués au sein du service de Biochimie et d'Hormonologie du CHU Charles Nicolle de Rouen. Le dosage de la vitamine D<sub>3</sub> a été effectué par immunochimiluminescence sur un automate Liaison XL (Diasorin, Soluggia, Italie). Les taux de calcium et de cholestérol ont été respectivement déterminés par spectrophotométrie et par méthode colorimétrique enzymatique sur un automate COBAS 8000 (Hitachi High Technologies Corp., Tokyo, Japon).

## V-HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHIMIE

### 1. Prélèvement du cœur et méthode de coupe de la valve aortique

Après le sacrifice, le cœur des souris a été prélevé par sternotomie médiane. Les cavités cardiaques ont été remplies avec du milieu de congélation pour tissus (TFM, Microm Microtech) et le cœur entier a été plongé dans l'azote liquide avant d'être congelé à -80°C. Des coupes de 7µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Microm HM 525, Microm Microtech). Les coupes de cœur ont été observées au fur et à mesure au microscope optique (Axioskop, Zeiss) afin d'identifier la valve aortique. Les coupes ont été conservées à -80°C.

### 2. Histologie

#### a. Coloration au rouge Sirius

Les coupes de valves aortiques ont été décongelées pendant 5 minutes à température ambiante. Elles ont ensuite été immergées dans un bain de liquide de Bouin (Q Path VWR) pendant 30 minutes à température ambiante. La solution de rouge Sirius était préparée par dilution de 0,1g de rouge Sirius (Direct Red 80, Thermoscientific) dans 100mL d'acide picrique à saturation dans de l'eau distillée. Les coupes ont été immergées dans un bain de rouge Sirius pendant 45 minutes à température ambiante. Elles ont été ensuite rincées rapidement dans un bain d'eau. Les coupes ont été déshydratées par allers-retours rapides dans un bain d'alcool 95% puis dans trois bains d'alcool 100%. Enfin, elles ont été passées dans un bain de xylène puis aussitôt montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage (Q Path Coverquick 2000, VWR).

#### b. Coloration au rouge alizarine

Les coupes de valves aortiques ont été décongelées pendant 5 minutes à température ambiante. Afin de visualiser les calcifications, une solution de rouge alizarine a été préparée par dilution de 1,37g de rouge alizarine (Santa Cruz) dans 100mL d'eau distillée. Le pH a été ajusté à 4,2 puis la solution a été filtrée avant utilisation. Les coupes ont été plongées dans le bain de rouge alizarine pendant 2 minutes à température ambiante. Les lames ont été immergées rapidement dans des bains successifs d'acétone, acétone/xylène (v/v) puis xylène. Les coupes ont enfin été montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage.

#### c. Quantification de la fibrose et des calcifications valvulaires

Les coupes de valves aortiques ont été observées au microscope optique (Axioskop, Zeiss) et une photo valve aortique entière a été effectuée. La fibrose ainsi que les calcifications

valvulaires ont été mesurées en utilisant le logiciel ImageJ par calcul du pourcentage de l'aire occupée par le collagène ou les calcifications sur l'aire totale de la valve aortique.

### 3. Immunohistochimie

Les immunomarquages tissulaires ont été réalisés sur les coupes de valves aortiques préalablement décrites. Les capillaires sanguins ont été identifiés par l'immunomarquage de la protéine transmembranaire PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) spécifique des cellules endothéliales. Les macrophages ont été visualisés par marquage de la glycoprotéine CD68. Les calcifications ont été mises en évidence par marquage de l'ostéopontine, une protéine d'adhérence du tissu osseux.

#### a. Immunomarquages

Les coupes ont été décongelées 5 minutes à température ambiante puis ont été fixées par immersion dans un bain d'acétone (Thermoscientific) pendant 10 minutes. Les coupes ont été ensuite réhydratées avec du PBS 1X (10 minutes) puis recouvertes d'une solution composée de BSA 3% (*bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich) et de saponine 0,3% (Sigma-Aldrich) pendant 20 minutes afin de saturer les sites non-spécifiques de marquage et de perméabiliser les membranes. Pour le marquage avec l'anticorps primaire biotinylé, les avidines et les biotines endogènes ont été préalablement bloquées pendant 10 minutes (*avidin/biotin blocking system*, Thermoscientific). Les anticorps primaires ont été incubés une heure à température ambiante (tableau 5). Les coupes ont été ensuite rincées plusieurs fois avec du PBS 1X, puis les anticorps secondaires ont été incubés pendant 30 minutes à température ambiante (tableau 6). Les coupes ont été rincées plusieurs fois avec du PBS 1X avant d'être montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield, Vector Laboratories), permettant de marquer les noyaux.

Cible	Marqueur	Dilution	Type d'anticorps	Fournisseur
Cellules endothéliales	PECAM-1	1/100 <sup>ème</sup>	Rat biotinylé	BD Science, BD553371
Macrophages	CD68	1/800 <sup>ème</sup>	Rat	BioRad, MCA341R
Tissu osseux	Ostéopontine	1/1000 <sup>ème</sup>	Lapin	Abcam, ab8448

**Tableau 5** : Anticorps primaires utilisés pour la réalisation de l'immunohistochimie.

<b>Anticorps secondaires</b>	<b>Dilution</b>	<b>Fournisseur</b>
Anticorps d'âne anti-lapin couplé à une Cyanine 3	1/400 <sup>ème</sup>	Jackson, 711-165-152
Anticorps d'âne anti-rat couplé au FITC	1/400 <sup>ème</sup>	Jackson, 712-545-153
Streptavidine couplée à une Cyanine 5	1/1500 <sup>ème</sup>	Interchim, FP-CA5570

**Tableau 6 : Anticorps secondaires utilisés pour la réalisation de l'immunohistochimie.**

#### b. Quantification de la densité capillaire, de l'inflammation et de la calcification

Les coupes de valves aortiques ont été observées au microscope à fluorescence (AxioImager J1, Zeiss). La densité capillaire a été rapportée comme le nombre de capillaires par valve aortique. L'inflammation et la calcification ont été évaluées par comptage des macrophages et des ostéoblastes par valve aortique.

## VI- CULTURE CELLULAIRE

Les cellules utilisées dans cette étude ont été cultivées de manière stérile sous un poste de sécurité microbiologique à flux laminaire. Les cellules ont ensuite été cultivées dans un incubateur à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en atmosphère humide.

### 1. Prélèvements humains et éthique

Les études impliquant des prélèvements humains ont été approuvées par le CPP « Nord Ouest I » (02/05/2016). Une lettre d'information et un formulaire de consentement a été obtenu pour chaque patient ayant subi un remplacement valvulaire aortique inclus dans l'étude. Les valves aortiques « sans sténose aortique » ont été obtenues chez des patients ayant subi une chirurgie de Bentall visant à remplacer une partie de l'aorte ascendante, la racine de l'aorte et la valve aortique. Seules les valves saines dépourvues de calcifications ont été considérées comme contrôles. Toutes les valves explantées chez les patients étiquetés comme ayant un RAC et avaient des calcifications importantes ont été considérées comme sténosées.

### 2. Isolation des cellules valvulaires aortiques

Après exérèse au bloc opératoire, la valve aortique a été plongée dans du sérum physiologique et transportée sur glace jusqu'au laboratoire.

#### a. Isolation des cellules endothéliales

Le feuillet valvulaire aortique a été lavé avec du DPBS 1X (*dulbecco's phosphate buffered saline*, Gibco) pour le débarrasser des débris. Le feuillet valvulaire en entier a ensuite été incubé pendant 5 minutes à 37°C sous agitation douce avec de la collagénase de type II (à 0,3%, Thermoscientific). Le feuillet valvulaire a été retiré et le surnageant est centrifugé 5 minutes à 1500g. Le culot cellulaire contenant les hVECs était resuspendu dans un milieu de culture complet EGM-2 (*endothelial cell growth medium 2*, PromoCell) additionné de facteurs de croissance (EGF, FGF, IGF et VEGF), d'acide ascorbique, d'héparine, d'hydrocortisone, d'antibiotiques (pénicilline/ streptomycine 1%) et de SVF (sérum de veau fœtal) à 2%.

Les hVECs ont été repiquées lorsque la culture cellulaire était à confluence. Les cellules ont été lavées avec du DPBS 1X et détachées de la flasque de culture par l'action de la trypsine (0,05%, Gibco) pendant 3 à 5 minutes à 37°C. L'action de la trypsine a été stoppée par ajout de milieu de culture complet. Les cellules ont été centrifugées 5 minutes à 1500g puis resuspendues dans le milieu de culture complet EGM-2. Les hVECs ont été comptées à l'aide d'une cellule de Malassez puisensemencées à une densité de  $5 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>. S'agissant d'une culture de cellules primaires, les hVECs n'ont jamais été utilisées au-delà du sixième passage.

#### b. Isolation des cellules interstitielles

Le feuillet valvulaire aortique a été découpé en plusieurs morceaux puis incubé 3 heures à 37°C sous agitation douce avec de la collagénase de type I (à 0,3%, Thermoscientific). Le surnageant a été filtré sur un tamis cellulaire de 40µm (Falcon). Le surnageant était ensuite centrifugé 5 minutes à 1500g. Le culot cellulaire contenant les hVICs a été resuspendu dans un milieu de culture classique DMEM (*dulbecco's modified eagle medium*, Gibco) additionné d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine 1%, Sigma-Aldrich) et de SVF 5% (Gibco). Les hVICs ont étéensemencées à une densité de  $3 \times 10^5$  cellules/cm dans des flasques de culture préalablement coatées avec du collagène de type I (100 µg/mL, Gibco). Les conditions de culture des hVICs étaient similaires à celles des hVECs, et elles n'ont jamais été utilisées au-delà du sixième passage.

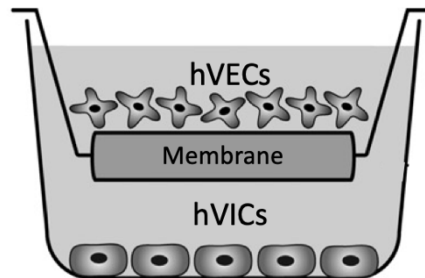
### 3. Milieu de culture pro-calcifiant

Pour notre étude, les hVICs ont été cultivées pendant 10 jours dans un milieu de culture pro-calcifiant contenant 1mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Thermoscientific) ou 1nM d'endothéline-1 (ET-1,

Sigma-Aldrich). L'ET-1 était renouvelée tous les jours. Le  $\text{NaH}_2\text{PO}_4^{2-}$  a été renouvelé uniquement lors du remplacement du milieu de culture trois fois par semaine.

#### 4. Co-culture

Les expériences de co-culture ont été effectuées dans un système Transwell afin de permettre les échanges à travers la membrane (membrane de polycarbonate de  $3\mu\text{m}$  d'épaisseur, pores de  $0,4\mu\text{m}$  de diamètre, Corning Life Sciences). Les hVICs ont étéensemencées dans le compartiment inférieur de la plaque 24 puits. Les hVECs ont étéensemencées séparément dans les inserts. Après 24h, les inserts contenant les hVECs ont été placées en co-culture indirecte avec les hVICs (figure 31).



**Figure 31** : Représentation schématique d'une co-culture en système Transwell.

## VII- IMMUNOCYTOCHIMIE

Afin de valider le phénotype des cellules valvulaires, des immunomarquages ont été réalisés sur les hVICs et hVECs préalablement décrites. Les hVICs ont été identifiées par l'immunomarquage des protéines intracellulaires  $\alpha\text{SMA}$  ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*) et vimentine, marqueurs du phénotype fibrotique des hVICs. Les hVECs ont été identifiées par l'immunomarquage de la protéine transmembranaire PECAM-1 spécifique des cellules endothéliales, et de la VE-cadherin (*vascular endothelial cadherin*), marqueur des jonctions intercellulaires de l'endothélium.

Les cellules étaient fixées avec du PFA 4% (paraformaldéhyde 4%) pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été rincées trois fois 5 minutes avec du PBS 1X avant d'être perméabilisées avec du méthanol froid pendant 10 minutes à  $-20^\circ\text{C}$ . Les cellules ont été à nouveau rincées trois fois avec du PBS 1X puis saturées avec une solution de BSA 3% pendant une heure à température ambiante. Les anticorps primaires ont été incubés toute la nuit à  $+4^\circ\text{C}$  (tableau 7). Les cellules ont ensuite été rincées trois fois avec du PBS 1X, puis les

anticorps secondaires ont été incubés pendant une heure à température ambiante (tableau 8). Pour le marquage avec l'anticorps anti-vimentine, une amplification a été effectuée avec le complexe streptavidine/biotine. Pour ce faire, les avidine et les biotine endogènes ont été préalablement bloquées pendant 15 minutes (*avidin/biotin blocking system*, ThermoScientific), puis un anticorps biotinylé d'âne anti-souris (Jackson, 715-066-151) a été incubé au 1/500<sup>ème</sup> pendant une heure à température ambiante. L'anticorps couplé au fluorochrome a ensuite été incubé (tableau 8). Les cellules ont été une nouvelle fois rincées trois fois avec du PBS 1X avant d'être montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield, Vector Laboratories), permettant de marquer les noyaux.

Cible	Marqueur	Dilution	Type d'anticorps	Fournisseur
Cellules endothéliales	PECAM-1	1/200 <sup>ème</sup>	Mouton	R&D Systems, AF806
Jonctions intercellulaires	VE-cadherin	1/100 <sup>ème</sup>	Lapin	Invitrogen, 36-1900
Filaments d'actine	$\alpha$ SMA	1/200 <sup>ème</sup>	Souris	Sigma, F3777
Filaments intermédiaires	Vimentine	1/200 <sup>ème</sup>	Souris	Sigma, V5255

**Tableau 7** : Anticorps primaires utilisés pour la réalisation de l'immunocytochimie.

Anticorps secondaires	Dilution	Fournisseur
Anticorps d'âne anti-lapin couplé au FITC	1/400 <sup>ème</sup>	Jackson, 711-095-152
Anticorps d'âne anti-mouton couplé à la Cyanine 3	1/400 <sup>ème</sup>	Jackson, 713-165-003
Streptavidine couplée à une Cyanine 3	1/1500 <sup>ème</sup>	Interchim, FP-CA5570

**Tableau 8** : Anticorps secondaires utilisés pour la réalisation de l'immunocytochimie.

## VIII- BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

### 1. RT-qPCR semi-quantitative en temps réel

#### a. Extraction des ARNs totaux

Les ARNs totaux ont été extraits à partir des cultures cellulaires de hVICs et de hVECs. Le milieu de culture a été aspiré et 1mL de TRIzol (Life technologies) a été ajouté pour une flasque T25 (ThermoScientific). Le tapis cellulaire a été récupéré par grattage et transféré dans un tube Eppendorf. Les échantillons ont été homogénéisés pendant 5 minutes à température ambiante,



puis 300µL de chloroforme (Sigma-Aldrich) est ajouté. Les tubes ont été vortexés puis incubés à température ambiante pendant 2 à 3 minutes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 15 minutes à 12000g à +4°C. À la suite de cette étape, l'ensemble des manipulations a été réalisé sur glace. La phase aqueuse a été transférée dans un nouvel Eppendorf et l'ARN était précipité par ajout de 500µL d'isopropanol (Fisher BioReagents). Les tubes ont été brièvement vortexés et incubés 10 minutes à température ambiante. Après une centrifugation à 12000g pendant 15 minutes à +4°C, le précipité d'ARN formait un culot colloïdal au fond du tube. Le surnageant a été jeté et l'ARN a été lavé par ajout de 1mL d'éthanol à 75% (Fisher BioReagents). Les tubes ont été agités puis centrifugés à 7500g pendant 5 minutes à +4°C. Les lavages ont été répétés trois fois. Lors du dernier lavage, le surnageant était jeté et le culot brièvement séché à l'air libre. Les ARNs ont été resuspendus dans 30µL d'eau RNase free (Life technologies). La qualité et la quantité des ARNs étaient évaluées par dosage au Nanodrop (Nanodrop 2000, ThermoScientific). Les ARNs ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

#### b. Traitement à la DNase I

Après l'extraction des ARNs totaux il peut persister une présence d'ADN pouvant biaiser les résultats. Un traitement à la DNase I (Invitrogen) a été effectué afin de débarrasser l'ARN de toutes éventuelles contaminations. Deux microgrammes d'ARN ont prélevés et complétés à 16µL d'eau RNase free. Un mix comprenant 2µL de DNase I et 2µL de tampon 10X était ajouté à chacun des échantillons. Les tubes ont été incubés 15 minutes à température ambiante. Deux microlitres d'EDTA ont été ajoutés à chaque échantillon puis les tubes ont été placés 10 minutes à 65°C. Les échantillons ont été à nouveau dosés au Nanodrop avant d'être conservés à -20°C.

#### c. Réaction de transcription inverse

Après le traitement à la DNase I, 1µg d'ARN était déposé dans un tube et complété avec 16,75µL d'eau RNase free. Un mix préparé de la façon suivante a été ajouté à chacun des échantillons :

- 3µL de dNTP (10mM, Invitrogen)
- 2,5µL de random primers (0,75µg/µL, Invitrogen)
- 0,75µL de RNase OUT (40U/µL, Invitrogen)
- 5µL de tampon 5X (M-MLV RT Buffer, Invitrogen)

Les tubes ont été ensuite incubés 5 minutes à 65°C. Un microlitre de transcriptase inverse (M-MLV reverse transcriptase 200U/ $\mu$ L, Invitrogen) était ajouté dans chacun des tubes avant d'être placés une heure à 37°C. Les échantillons ont été enfin incubés 5 minutes à 95°C pour dénaturer l'enzyme. Les produits de la transcription inverse ont été conservés à -20°C avant d'être utilisés.

#### d. PCR quantitative

Les produits issus de la réaction de transcription inverse ont été amplifiés par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) grâce à un appareil de RT-qPCR (Light Cycler LC480, Roche). La qPCR permet le suivi en temps réel de l'amplification grâce à la détection de la fluorescence émise par le SYBR Green (Roche), un agent intercalant de l'ADN double brin néo-formé<sup>141</sup>. La fluorescence émise par le SYBR Green est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié.

<b>Dénaturation</b>	<b>Amplification</b>		
95°C, 10min	40 cycles		
	<b>Dénaturation</b> 95°C, 10s	<b>Hybridation</b> 60°C, 10s	<b>Élongation</b> Variable selon la taille de l'amorce

**Tableau 9** : Condition de programmation de la PCR quantitative.

Pour procéder à l'amplification, un mix a été préparé de la façon suivante :

- 1,5 $\mu$ L d'eau RNase free
- 0,5 $\mu$ L de l'amorce sens du gène d'intérêt
- 0,5 $\mu$ L de l'amorce anti-sens du gène d'intérêt
- 5 $\mu$ L de SYBR Green I

7,5 $\mu$ L de ce mix ont été déposés dans chaque puits d'une plaque 96 puits (Corning) préalablement déposée sur un bloc froid. Les échantillons de la réaction de transcription inverse ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau RNase free, puis 2,5 $\mu$ L de chaque échantillon dilué a été déposé dans la plaque 96 puits pour chacun des gènes d'intérêts étudiés. La plaque était ensuite centrifugée quelques secondes à 500g à +4°C puis placée dans l'appareil de PCR quantitative (Light Cycler LC480, Roche). La PCR quantitative se déroulait selon la programmation référencée dans le tableau 9. Le logiciel LightCycler LC480 permet de calculer la concentration d'ADNc cible grâce à la réalisation d'une gamme de dilution établie par un mélange d'ADNc de chacun des échantillons étudiés. Les résultats obtenus ont ensuite été rationalisés par rapport au gène de ménage.

	Gène	Séquence	Taille de l'amplicon
<b>Gène de ménage</b>	<i>HPRT1</i>	Sens 5'-CATTATGCTGAGGATTTGGAAAGG-3' Anti-sens 5'-CTTGAGCACACAGAGGGGCTACA-3'	129 pb
<b>Gènes d'intérêts</b>	<i>ACTA2</i>	Sens 5'-CGGTGCTGTCTCTCTATGCC-3' Anti-sens 5'-CGCTCAGTCAGGATCTTCA-3'	175 pb
	<i>BMP2</i>	Sens 5'-TGTATCGCAGGCACTCAGGTCA-3' Anti-sens 5'-CCACTCGTTTCTGGTAGTTCTTC-3'	133 pb
	<i>ECE1</i>	Sens 5'-TGGATCAAGGCCAACCCA-3' Anti-sens 5'-CAGAGGTTGCTGAAGGTCCC-3'	62 pb
	<i>EDN1</i>	Sens 5'-CTACTTCTGCCACCTGGACATC-3' Anti-sens 5'-TCACGGTCTGTTGCCTTTGTGG-3'	126 pb
	<i>EDNRA</i>	Sens 5'-GCGATTGGCTTCGTCATGGTAC-3' Anti-sens 5'-GAAGATCGCAGTGCACACCAAG-3'	162 pb
	<i>EDNRB</i>	Sens 5'-CAGAAAGCCTCCGTGGGAATCA-3' Anti-sens 5'-ACAGCCAGAACCACAGAGACCA-3'	122 pb
	<i>IL6</i>	Sens 5'-AGACAGCCACTCACCTCTTCAG-3' Anti-sens 5'-TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG-3'	132 pb
	<i>OPN</i>	Sens 5'-CGAGGTGATAGTGTGGTTTATGG-3' Anti-sens 5'-GCACCATTCAACTCCTCGCTTTC-3'	128 pb

**Tableau 10** : Séquences sens et anti-sens des amorces humaines utilisées pour la qPCR.

## 2. Western Blot

### a. Méthode d'extraction des protéines

Les cellules ont été rincées avec du DPBS 1X puis incubées avec 300µL de tampon de lyse RIPA contenant des anti-protéases (cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, *EASYPack*, Roche) et des anti-phosphatases (PhosSTOP *EASYPack*, Roche). Les cellules ont été centrifugées à 13 000g pendant 10 minutes à +4°C afin de récupérer le surnageant contenant les protéines. La quantité de protéines présentes dans le surnageant a ensuite été dosée selon la méthode de Bradford.

### b. Mesure de l'expression protéique

Le volume de l'homogénat contenant 20µg de protéines a été complété à 40µL de volume total avec du bleu de Laemmli 1X (4X *Laemmli sample buffer*, Biorad) et du β-mercaptoéthanol 10% (2-Mercaptoéthanol >=98%, Sigma), puis chauffé 5 minutes à +95°C pour optimiser la dénaturation des protéines. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel 4-15% (Mini-PROTEAN®TGX Stain-Free™ Precast Gels, BioRad) (10 minutes à 110V, puis 30 à 45 minutes à 200V), puis elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (TransBlot® Turbo™ Midi-size Nitrocellulose, BioRad). Les sites non-spécifiques ont été bloqués avec une solution de TBS-T 1X (*tris-buffered saline tween 20*) à 5% de BSA sous agitation constante pendant 1h à température ambiante. La membrane était ensuite incubée avec l'anticorps primaire sous agitation constante toute la nuit à +4°C (tableau 11). La membrane était lavée trois fois 5 minutes avec du TBS-T 1X puis incubée avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin sous agitation constante pendant 1h à température ambiante (1/5000<sup>ème</sup>, Jackson Immuno-Research). La membrane était à nouveau lavée trois fois 5 minutes avec du TBS-T 1X puis révélée à l'aide du ChemiDoc XRS+ (BioRad). L'intensité des bandes obtenues a été mesurée grâce au logiciel Image Lab (BioRad). La quantité protéine était normalisée sur le contrôle de charge.

Cible	Dilution	Type d'anticorps	Fournisseur
Ostéopontine	1/5000 <sup>ème</sup>	Lapin	Abcam
Alcaline phosphatase	1/5000 <sup>ème</sup>	Lapin	Abcam

**Tableau 11** : Anticorps primaires utilisés pour la réalisation du western blot

### 3. Mesure du calcium : méthode de dosage o-crésolphthaléine

Le calcium a été mesuré de manière directe par la méthode du dosage au o-crésolphthaléine dont le principe repose sur la formation d'un complexe entre le calcium et l'ortho-crésolphthaléine. Pour ce faire, les cellules ont été rincées avec du PBS 1X et incubées avec du HCl 0,6N toute la nuit sous agitation constante à +4°C. Le surnageant de décalcification était récupéré et déposé dans une plaque 96 puits (Falcon) puis lue au spectrophotomètre à 565nm (Spark® Multimode microplate reader, Tecan). La quantité de calcium a été calculée à partir d'une droite de régression linéaire.

## IX- ANALYSES STATISTIQUES

Selon la distribution de la variable, les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type (SD, *standard deviation*) ou médiane (du 25<sup>ème</sup> au 75<sup>ème</sup> interquartile). La normalité des distributions a été évaluée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Dans le cas d'une distribution normale, les tests paramétriques ont été appliqués. Dans le cas contraire, nous avons utilisées des tests non-paramétriques. Les comparaisons entre deux groupes ont été effectuées à l'aide du test de Student lorsque la distribution suivait une loi normale, ou par un test de Mann-Whitney dans le cas contraire. Pour les comparaisons de trois groupes et plus, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé. Les valeurs de  $P < 0,05$  étaient considérées comme significatives. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels GraphPad Prism (version 6.0) et SPSS (version 17.0).

CHAPITRE III  
*Résultats & Discussions*

---

*Les résultats de l'étude 1 sont présentés sous forme d'article*



## Étude 1

Effet d'une alimentation riche en graisse et d'une supplémentation en vitamine D<sub>3</sub> dans l'établissement du rétrécissement aortique chez des souris mutées sur le récepteur du facteur de croissance épidermique.

Le rétrécissement aortique calcifié (RAC) est la valvulopathie la plus fréquente dans les pays industrialisés et il n'existe à ce jour aucun traitement pour ralentir ou arrêter la progression de cette maladie. L'utilisation de modèles animaux de RAC est ainsi essentielle pour mieux comprendre sa physiopathologie et évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Un modèle de souris génétiquement modifié pour le récepteur du facteur de croissance épidermique (*Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>*) a été proposé ; cependant, les résultats indiquent la présence d'une insuffisance aortique (IA) prédominante avec le développement d'un RAC qui reste rare ou absent.

Nous avons cherché à évaluer les effets d'un régime enrichi en graisse et d'une supplémentation en vitamine D<sub>3</sub> dans ce modèle.

Nous avons dans un premier temps optimisé la dose et la voie d'administration de vitamine D<sub>3</sub>. Pendant un mois, des souris WT C57BL/6J ont été injectées avec des faibles ou fortes doses en vitamine D<sub>3</sub> (*ip.*, *sc.* et gavage) et ont été nourries avec deux régimes HFD.

Par la suite, des souris *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* âgées de six semaines ont été nourries avec un régime enrichi en graisses et ont reçu des injections de vitamine D<sub>3</sub> en sous-cutanée pendant 6 (n=16) ou 9 mois (n=11). Les souris témoins n'ont reçu aucune supplémentation (n=12).

Afin de suivre l'évolution du développement du RAC, des échocardiographies ont été effectuées à 3, 6 et 9 mois. L'analyse du sérum sanguin (calcium, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et cholestérol total), l'histologie et l'immunohistochimie (CD-31, CD-68 et ostéopontine) ont été évaluées au terme du protocole (à 6 ou 9 mois).

Dans cette étude, nous avons montré que l'administration de vitamine D<sub>3</sub> et d'un régime enrichi en graisses induisait une augmentation significative des niveaux de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et de cholestérol total dans les groupes traités à 6 et 9 mois (figure 1).

Les données échocardiographiques n'ont pas permis de mettre en évidence une amélioration du modèle *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>*. Un RAC a été détecté chez seulement 6 animaux, soit 15,3% des souris (deux animaux dans chaque groupe). L'IA restait prédominante chez la majorité des autres animaux (figure 2).



La fibrose, l'épaisseur valvulaire, les calcifications, la densité vasculaire et l'inflammation n'étaient pas significativement différents entre le groupe contrôle et les groupes traités à 6 et 9 mois (figures 3 et 4).

Enfin, la comparaison entre les animaux possédant ou non un RAC n'a pas révélée de différences significatives au niveau des données échocardiographiques ou histologiques et immunohistochimiques entre ces deux groupes (figure 5).

Les résultats de cette étude suggèrent que le régime enrichi en graisses et la supplémentation en vitamine D<sub>3</sub> n'ont pas d'effets sur le modèle *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>*. Ce modèle de souris est essentiellement un modèle d'IA, mais rarement de RAC. D'autres études sont ainsi nécessaires pour trouver un modèle animal de RAC fiable et reproductible.



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Integrative Medicine

journal homepage: [www.jcimjournal.com/jim](http://www.jcimjournal.com/jim)  
[www.journals.elsevier.com/journal-of-integrative-medicine](http://www.journals.elsevier.com/journal-of-integrative-medicine)

## Original Research Article

Impact of high-fat diet and vitamin D<sub>3</sub> supplementation on aortic stenosis establishment in waved-2 epidermal growth factor receptor mutant miceB er enice Colleville<sup>a,b</sup>, Nicolas Perzo<sup>a,b</sup>, Guillaume Avinée<sup>a,b,c</sup>, Ana is Dumesnil<sup>a,b</sup>, Frederic Ziegler<sup>d,e</sup>, Paul Billoir<sup>a,b,f</sup>, Hélène Eltchaninoff<sup>a,b,c</sup>, Vincent Richard<sup>a,b</sup>, Eric Durand<sup>a,b,c,\*</sup><sup>a</sup> Department of Biology, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1096 (Endothélium, Valvulopathies et Insuffisance Cardiaque), Normandie University, Unirouen, 76000 Rouen, France<sup>b</sup> Fédération Hospitalo-Universitaire REMODEling in Valvulopathy and Heart Failure, Rouen, France<sup>c</sup> Department of Cardiology, Rouen University Hospital, 76031 Rouen Cedex, France<sup>d</sup> Department of Biology, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1073 (Nutrition, Inflammation et Dysfonction de l'axe Intestin-Cerveau), Normandie University, Unirouen, 76000 Rouen, France<sup>e</sup> Institute for Clinical Biology—General Biochemistry Unit, Rouen University Hospital, 76031 Rouen Cedex, France<sup>f</sup> Department of Vascular Hemostasis, Rouen University Hospital, 76031 Rouen Cedex, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 September 2018

Accepted 28 November 2018

Available online 30 January 2019

## Keywords:

Experimental model

Epidermal growth factor receptor

Vitamin D<sub>3</sub>

High-fat diet

Aortic stenosis

Aortic regurgitation

## ABSTRACT

**Objective:** The use of animal models of aortic stenosis (AS) remains essential to further elucidate its pathophysiology and to evaluate new therapeutic strategies. The waved-2 mouse AS model has been proposed; data have indicated that while aortic regurgitation (AR) is effectively induced, development of AS is rare. We aimed to evaluate the effect of high-fat diet (HFD) and vitamin D<sub>3</sub> supplementation in this model.

**Methods:** HFD and subcutaneous vitamin D<sub>3</sub> injections were initiated at the age of 6 weeks until the age of 6 (*n* = 16, 6-month treatment group) and 9 (*n* = 11, 9-month treatment group) months. Twelve waved-2 mice without supplementation were used as control. Echocardiography was performed at 3, 6 and 9 months. Blood serum analysis (calcium, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and cholesterol), histology and immunohistochemistry (CD-31, CD-68 and osteopontin) were evaluated at the end of the experiment (6 or 9 months).

**Results:** Total cholesterol and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> were significantly increased relative to the control group. HFD and vitamin D<sub>3</sub> supplementation did result in improvements to the model, since AS was only detected in 6 (15.3%) mice (2 in the 3 groups) and AR was developed in the remaining animals. Echocardiographic parameters, fibrosis, thickness, inflammation and valvular calcification, were not significantly different between the 6-month treatment and control groups. Similar results were also observed in the 9-month treatment group.

**Conclusion:** These results suggest that HFD and vitamin D<sub>3</sub> supplementation have no effect in the waved-2 mouse model. This model essentially mimics AR and rarely AS. Further studies are needed to find a reliable animal model of AS.

Please cite this article as: Colleville B, Perzo N, Avinée G, Dumesnil A, Ziegler F, Billoir P, Eltchaninoff H, Richard V, Durand E. Impact of high-fat diet and vitamin D<sub>3</sub> supplementation on aortic stenosis establishment in waved-2 epidermal growth factor receptor mutant mice. *J Integr Med.* 2019; 17(2): 107–114.

  2019 Shanghai Changhai Hospital. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Aortic stenosis (AS) is the most common acquired valvulopathy in Western countries and the third leading cause of cardiovascular

diseases [1,2]. Approximately 2.8% of people aged over 75 years develop moderate or severe AS [3]. AS is a slow and progressive disorder characterized by thickening and calcificating of aortic valve leaflets [2,4]. The physiopathology of AS is not fully understood, and there is, to date, no treatment to stop or slow the progression of AS [5]. To define and evaluate new therapeutic strategies, animal models of AS remain essential.

\* Corresponding author at: Department of Biology, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1096 (Endothélium, Valvulopathies et Insuffisance Cardiaque), Normandie University, Unirouen, 76000 Rouen, France.

E-mail address: [eric.durand@chu-rouen.fr](mailto:eric.durand@chu-rouen.fr) (E. Durand).

Various animal models have been proposed, but none of these models truly mimic human AS [5–7]. Indeed, the increase of transaortic mean gradient in these models is not systematically associated with valvular thickening and calcification, which are the main characteristics of AS.

The waved-2 mouse model has been proposed as a potentially interesting model of AS. It consists of a single-nucleotide homozygous substitution mutation in the gene encoding epidermal growth factor receptor (EGFR) [8]. Waved-2 mice have a 90% reduction in EGFR-tyrosine kinase activity [8]. However, recently it has been shown that aortic regurgitation (AR) was frequent in this model and that AS was rare or absent [9].

Previous studies showed that high-fat diet (HFD) can promote valve thickening, pro-inflammatory states and osteoblastic differentiation [6,7], and excessive vitamin D<sub>3</sub> supplementation induces arterial and valvular calcification [10–15]. Furthermore, Drolet et al. [10] have shown in rabbits that vitamin D<sub>3</sub> supplementation (in association with high-cholesterol diet) induced aortic valvular calcification, whereas a high-cholesterol diet without vitamin D<sub>3</sub> supplementation had no effect. The authors therefore hypothesized that the combination of HFD and vitamin D<sub>3</sub> supplementation could improve aortic valve calcification occurrence and AS severity in the waved-2 mouse model [16,17].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Four waved-2 heterozygous mice (C57BL/6J *Egfr*<sup>Wav2/+</sup>) were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Animal housing and experiments were in accordance with National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals (8th edition), and the study ethics were approved by the Normandy University regional review board, according to French and European Union legislation (APAFIS#9108-2017030215075973). C57BL/6J *Egfr*<sup>Wav2/+</sup> mice were crossed to obtain waved-2 homozygous mice (C57BL/6J *Egfr*<sup>Wav2/Wav2</sup>). Homozygous pups were identified by their curly fur phenotype and confirmed by polymerase chain reaction. Adult waved-2 mice were kept in standard conditions, under a 12-hour light/dark cycle at a temperature of (22 ± 1) °C and had free access to food and water.

### 2.2. Method of administration

In order to assess the best method of inducing calcium and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> elevation, 3 modes of vitamin D<sub>3</sub> supplementation were first evaluated in C57BL/6J mice. Vitamin D<sub>3</sub> was administered three times a week for 1 month by gavage (20,000,000 IU/g), intraperitoneal injection (2000 IU/g) or subcutaneous injection (16,000 IU/g). Five control C57BL/6J mice with no vitamin D<sub>3</sub> administration were also used for these experiments. Mice were sacrificed after 1 month of treatment for blood serum analysis. Each dose was selected according to previous studies [13–15].

### 2.3. Vitamin D<sub>3</sub> supplementation and HFD

Male and female waved-2 mice, 1.5 months of age, were fed with U8951 HFD (SAFE, Augy, France), containing 65.7% lipids, 19.5% carbohydrate, and 4.5% cholesterol, and providing 4893.7 kcal/kg, including 3215.9 kcal/kg as fat. Animals were subcutaneously injected three times a week with 16,000 IU/g vitamin D<sub>3</sub> (Supelco Cholecalciferol D3, Cat#47763, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) until 6 months of age (*n* = 16, 8 males and 8 females, 6-month treatment group). Twelve waved-2 mice fed without HFD and receiving no subcutaneous injection of vitamin D<sub>3</sub> were used as a control group (7 males and 5 females). Addi-

tional waved-2 mice were used to evaluate the longer-term effect of HFD and of vitamin D<sub>3</sub> supplementation and continued receiving treatment until 9 months of age (*n* = 11, 4 males and 7 females, 9-month treatment group). Body weight was measured before any injections and food intake was calculated for each cage.

### 2.4. Blood serum analysis

At the age of 6 months, mice were sedated (xylazine 10 mg/kg + ketamine 100 mg/kg) and whole blood was collected. Blood samples were placed at room temperature for 1 h and then centrifuged at 3000 × *g* for 15 min to obtain blood serum. An assay for 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> was performed using chemiluminescence immunoassay with a LIAISON XL analyzer (DiaSorin, Saluggia, Italy). Calcium and cholesterol assays were respectively conducted using spectrophotometry and enzymatic methods with a COBAS 8000 analyzer (Hitachi High Technologies Corp., Tokyo, Japan) [18].

### 2.5. Echocardiography

Echocardiography was performed in sedated mice (isoflurane 1%) at the age of 3 and 6 months in the control and 6-month treatment groups and at the age of 9 months in the 9-month treatment group. Previous studies have shown that valvular abnormalities are present in this model as early as the 3rd month and worsened in the 6th month [8]. We also evaluated the effect at 9 months in order to verify that there was no delayed effect of HFD and vitamin D<sub>3</sub> supplementation. Echocardiograms were obtained using Vivid7 ultrasound echocardiograph equipped with a 10S pediatric probe and a M12L linear probe, operating at 14 MHz (General Electric Healthcare, Little Chalfont, UK). Time-motion analysis was performed using the small parasternal axis. Left ventricular diameter, interventricular septum and left ventricular posterior wall thickness were measured in end-diastole and end-systole, and fractional shortening was calculated. Time-motion analysis was also used to assess aortic cusp separation. Continuous and color Doppler was used to assess aortic valve function. The presence of AS was defined by an aortic cusp separation < 0.66 mm as previously described [9], whereas the presence of moderate/severe AR was assessed by color Doppler. We also evaluated aortic peak jet velocity and mean aortic gradient by continuous Doppler. Image analysis was performed using Echopac PC software (General Electric Healthcare, Little Chalfont, UK).

### 2.6. Valve histology

After sacrifice, the heart was excised and frozen. Cardiac sections were cut at 7 μm thickness. Valve sections were stained with Alizarin red, oil red O and Sirius red [9] to respectively evaluate calcifications, lipid deposition and fibrosis and were imaged with a light microscope (Zeiss, Jena, Germany). Image analysis was performed with ImageJ software (version 1.0, NIH, Maryland). Calcium and collagen were calculated as a percentage of positive staining over the total valve area. Valve thickness was determined by tracing the valve transversal plan.

### 2.7. Immunohistochemistry

Cardiac cryosections (7 μm) were fixed in acetone and non-specific sites were blocked with 3% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). Immunostaining was performed as previously described [19]. Briefly, primary antibodies against osteopontin (Abcam, 1:1000), CD68 (Biorad, 1:800) and CD31 (BD Pharmingen, 1:100) were incubated 1 h at room temperature, followed by repeated washing in phosphate-buffered saline 1 × and incubation with secondary antibodies for 30 min. Slides were mounted in Vec-



tashield containing 4'-6-diamidino-2-phenylindole; images were acquired using a Zeiss epifluorescence microscope (Axiomager J1) and were analyzed using ImageJ software.

## 2.8. Statistical analysis

Categorical variables are presented as absolute and relative frequencies and were compared by the  $\chi^2$  or the Fisher exact test. Continuous data are presented as mean  $\pm$  standard deviation or median (the 25th to 75th interquartile range) depending on variable distribution. Normality of the distributions was assessed with the Shapiro–Wilk test. Comparisons between two groups were performed using the Student *t* test or the Mann–Whitney rank-sum test, as appropriate. In case of comparison among 3 groups or more, an analysis of variance test or a Kruskal–Wallis test was used depending on variable distribution. A *P* value <0.05 was considered to be significant. All tests were two-sided. The statistical analysis was performed using SPSS software (version 17.0, IBM, Armonk, New York).

**Table 1**  
General information about the animals.

General information	Control group (n = 12)	6-Month treatment group (n = 16)	9-Month treatment group (n = 11)
Beginning-treatment weight (g)	20.50 $\pm$ 0.70	16.82 $\pm$ 0.69	18.55 $\pm$ 0.68
End-treatment weight (g)	26.90 $\pm$ 1.50	27.24 $\pm$ 1.40	26.00 $\pm$ 1.49
Food intake per day (g)	3.70 $\pm$ 0.08	2.56 $\pm$ 0.04	2.13 $\pm$ 0.07
Energy intake per day (kcal/g)	12.57 $\pm$ 0.26	12.51 $\pm$ 0.18	10.41 $\pm$ 0.34
Lipids energy intake per day (kcal/g)	0.64 $\pm$ 0.01	8.22 $\pm$ 0.12	6.84 $\pm$ 0.22
Heart weight (mg)	207.60 $\pm$ 21.65	195.90 $\pm$ 15.11	216.50 $\pm$ 31.76
Tibia length (mm)	18.79 $\pm$ 0.33	17.57 $\pm$ 0.29	17.90 $\pm$ 0.41
Ratio of heart weight/tibia length	10.94 $\pm$ 1.49	11.24 $\pm$ 0.96	12.24 $\pm$ 1.89

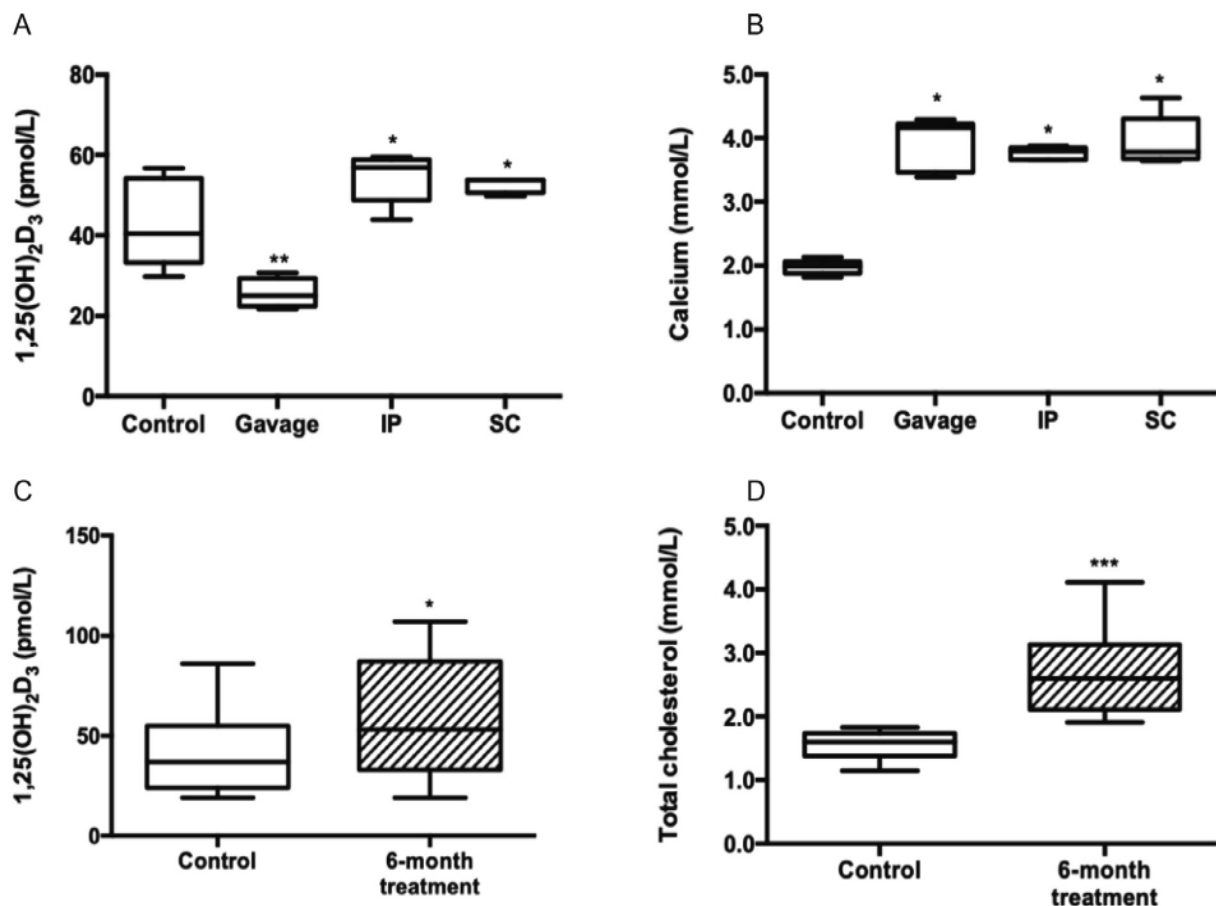
## 3. Results

### 3.1. General information

The general information about the animals (weight before and at the end of the study, intake of diet and energy, and weight of the organs) is shown in Table 1.

### 3.2. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, calcium and cholesterol biochemical assays

To optimize vitamin D<sub>3</sub> supplementation, the authors tested 3 modes of administration in C57BL6/J mice. After 1-month injections, blood serum analysis revealed a significant increase of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> level in intraperitoneal and subcutaneous groups and an unexpected significant decrease in the gavage group (Fig. 1A). Serum level of calcium was significantly increased and very high after each of the 3 modes of administration in C57BL6/J mice (Fig. 1B). Interestingly, the calcium concentration was doubled in the gavage group despite low 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> levels (Fig. 1A and B). For simplicity, we chose to use the subcuta-



**Fig. 1.** Blood serum analysis. Box plot analysis of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (A) and calcium (B) after 1 month of vitamin D<sub>3</sub> administration by gavage or intraperitoneal (IP) or subcutaneous (SC) injections in C57BL6/J mice (n = 5 per group), and box plot analysis of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (C) and total cholesterol (D) in control waved-2 mice (n = 12) and 6-month treatment waved-2 group (n = 16). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, vs control group.

neous injection of vitamin D<sub>3</sub> as the delivery mechanism for this study.

In the waved-2 mice of 6-month treatment group, serum levels of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and calcium were significantly increased compared to the control waved-2 mice and were similar to those obtained in C57BL6/J mice (Fig. 1A and C). Waved-2 mice fed with HFD had significantly elevated total cholesterol levels compared to the control group (Fig. 1D).

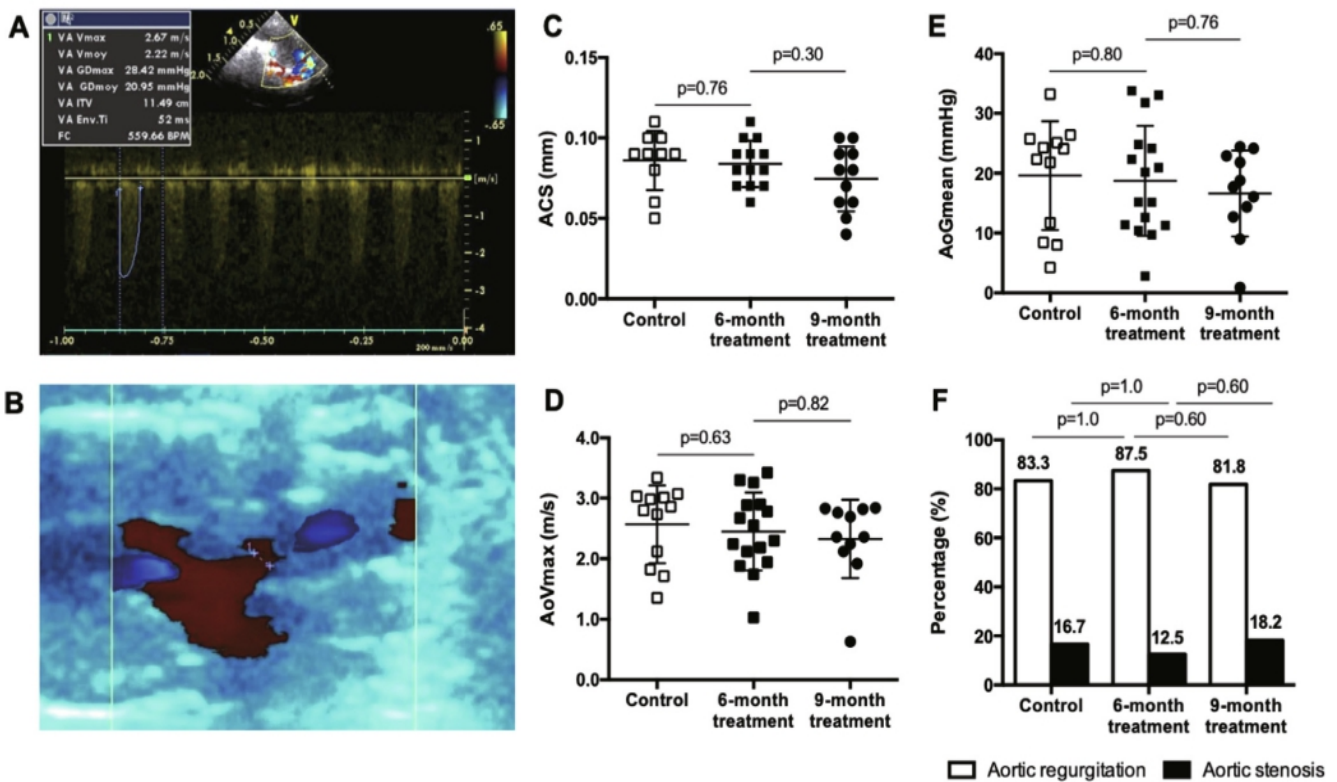
### 3.3. Echocardiographic assessment

The results are summarized in Fig. 2 and Table 2. An example of continuous and color Doppler is shown in Fig. 2A and B respectively. Six (15.3%) animals (2 in the 6-month treatment group, 2 in the control group and 2 in the 9-month treatment group) presented pure AS (Fig. 2C), defined by an aortic cusp separation  $\leq 0.66$  mm (Fig. 2E). In all the remaining animals, moderate or severe pure AR was present, without significant difference between the two groups. Aortic peak jet velocity and mean aortic gradient were also similar at 6 months of age without any effect of HFD

and subcutaneous vitamin D<sub>3</sub> supplementation as compared to the control group (Fig. 2D and F). Finally, left ventricular parameters were also similar without any significant difference between the 6-month treatment group and the control group (Table 2). The authors also compared all the echocardiographic parameters between the 6-month treatment and the 9-month treatment groups. We observed no significant variation, suggesting no delayed effect of HFD and vitamin D<sub>3</sub> supplementation (Fig. 2 and Table 2). Moreover, no significant difference was observed in male and female mice in each group (data not shown).

### 3.4. Morphological changes in aortic valve

Histomorphometry and histological staining were performed at the age of 6 months in the 6-month treatment and the control groups and at the age of 9 months in the 9-month treatment group (Fig. 3). Aortic valves were thickened and very fibrous but without significant difference between the 6-month treatment and control groups or between the 6-month treatment and the 9-month treatment groups (Fig. 3A and B). Interestingly, aortic valve calcification



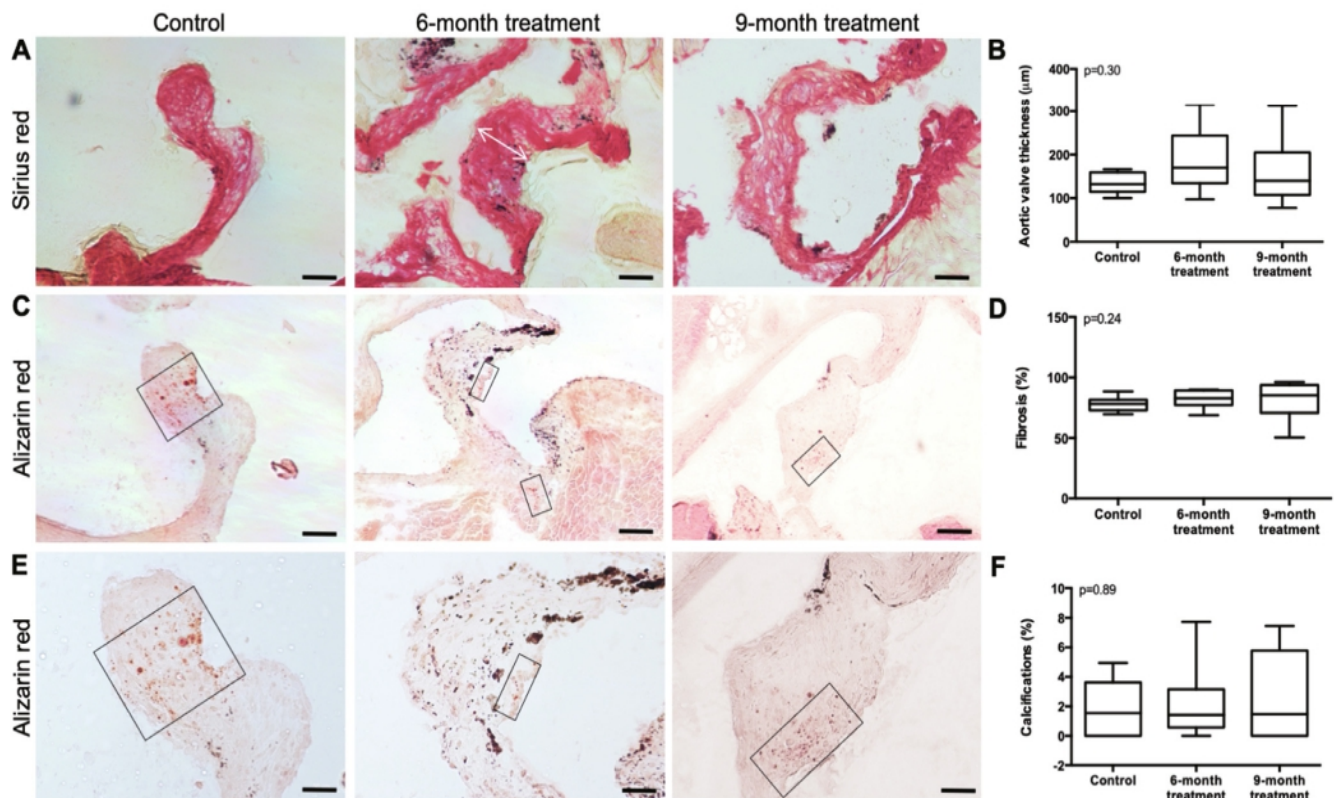
**Fig. 2.** Echocardiographic evaluation of aortic valve function. (A) Representative continuous Doppler for quantification of aortic peak jet velocity (AoVmax) and mean aortic gradient (AoGmean). (B) Representative color Doppler profile for aortic regurgitation (AR); blue jet indicates regurgitant flow across the aortic valve. (C–F) Measurements of aortic cusp separation (ACS, C), maximal aortic peak velocity (AoVmax, D), bar graph occurrence of aortic stenosis (AS) and moderate/severe AR (E), and mean aortic gradient (AoGmean, F) in control ( $n = 12$ ), 6-month treatment ( $n = 16$ ) and 9-month treatment ( $n = 11$ ) groups.

**Table 2**  
Left ventricular function and dimensions.

Echocardiographic parameters	Control group ( $n = 12$ )	6-Month treatment group ( $n = 16$ )	9-Month treatment group ( $n = 11$ )	P value
LVEF (%)	70.0 $\pm$ 10.3	64.6 $\pm$ 13.5	76.0 $\pm$ 16.4	0.11
FS (%)	34.1 $\pm$ 8.3	31.4 $\pm$ 9.5	41.3 $\pm$ 12.3	0.06
IVSd thickness (mm)	1.0 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	0.30
IVSs thickness (mm)	1.3 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.2	0.33
LVPWd thickness (mm)	1.1 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	0.41
LVPWs thickness (mm)	1.5 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.3	0.44
LVd (mm)	3.9 $\pm$ 0.9	3.8 $\pm$ 0.5	3.9 $\pm$ 1.3	0.95
LVs (mm)	2.6 $\pm$ 0.8	2.6 $\pm$ 0.6	2.4 $\pm$ 1.4	0.84

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Comparison among the 3 groups was performed using an analysis of variance test. LVEF: left ventricular ejection fraction; FS: fractional shortening; IVSd: end-diastolic interventricular septum; IVSs: end-systolic interventricular septum; LVPWd: end-diastolic left ventricular posterior wall; LVPWs: end-systolic left ventricular posterior wall; LVd: left ventricular end-diastolic diameter; LVs: left ventricular end-systolic diameter.





**Fig. 3.** Histology of waved-2 mouse aortic valve. (A, C and E) Examples of visualization of aortic valve collagen (A) and calcification (C, E) in control, 6-month treatment and 9-month treatment groups using Sirius red and Alizarin red staining, respectively. Positive alizarin cells (red) are identified by a black rectangle; spontaneous dark brown staining represents lipofuscin. Aortic valve thickness was analyzed using Sirius red staining (white arrow, A). (B, D and F) Box plot representation of valve fibrosis (B), valve thickness (D), and calcification (F) in control ( $n = 12$ , white), 6-month treatment (gray,  $n = 16$ ) and 9-month treatment (black,  $n = 11$ ) groups. The percentage represents the proportion of positive staining. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$  (A, C); scale bar = 50  $\mu\text{m}$  (E).

was very low in each group (Fig. 3C–F). Lipid deposition was nearly undetectable in all groups (data not shown). Again, we observed no significant difference in male and female mice in each group (data not shown).

### 3.5. Immunohistochemistry

We used osteopontin and CD-68 antibodies to assess osteogenic markers of calcification and inflammation, respectively. CD-31 antibody was also evaluated to assess endothelial cells and neoangiogenesis. Examples of immunohistochemistry in control and 6-month treatment aortic valves are shown in Fig. 4. Osteopontin, which stimulates differentiation of valvular interstitial cells into osteoblasts, was present in all groups (Fig. 4A) without significant difference between the 6-month treatment and control groups or the 6-month treatment and 9-month treatment groups (Fig. 4B). Similarly, CD-68 immunohistochemical staining revealed no statistical difference in macrophage expression in aortic valves (Fig. 4C and D). Blood vessel density, represented by CD31-positive cells, was also not significantly different between groups (Fig. 4E and F).

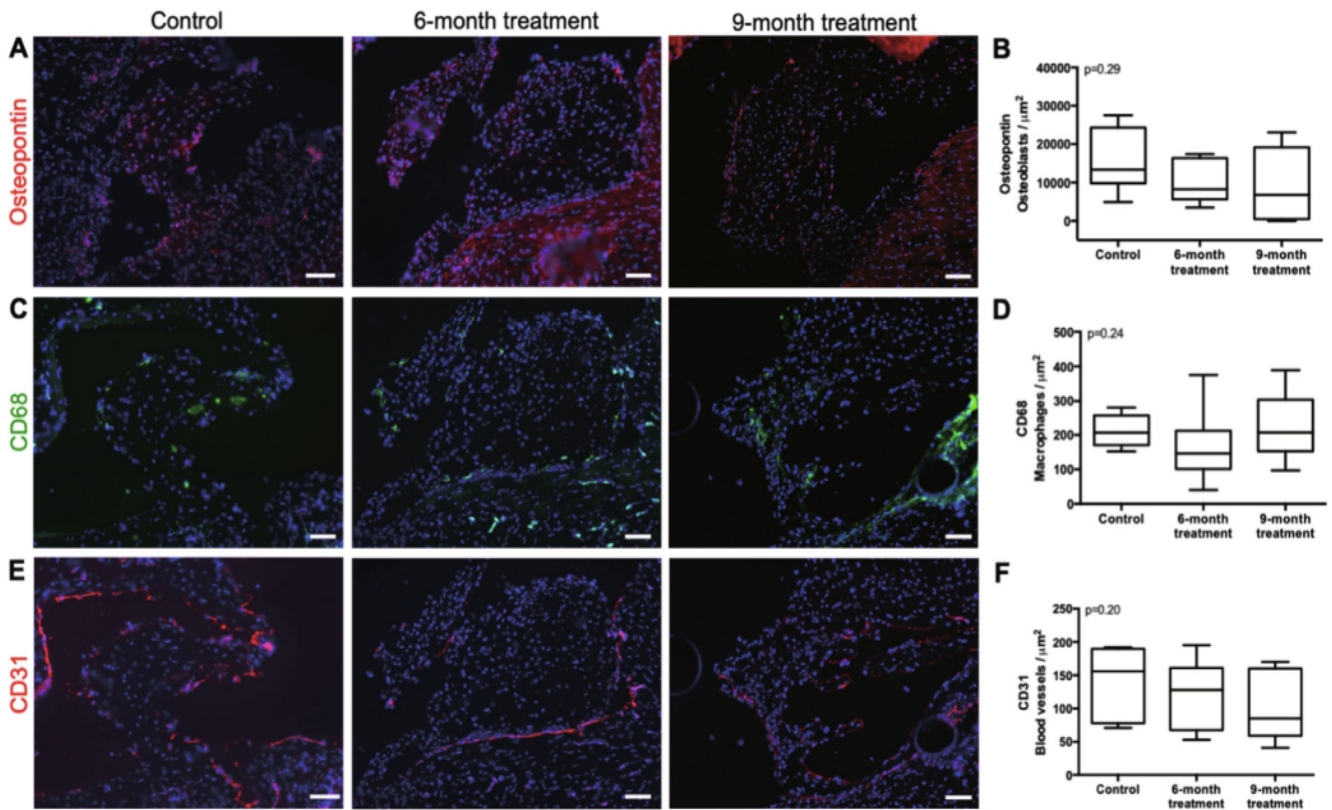
### 3.6. Comparison of animals with and without AS

As mentioned previously, six animals (two in each group) had severe AS, whereas 33 animals had severe AR. Comparison of animals with ( $n = 6$ ) or without ( $n = 33$ ) AS is shown in Fig. 5. Mean aortic gradient and maximal aortic peak velocity were not significantly different in animals with or without AS (Fig. 5A and B). Valve thickness, fibrosis, calcification, osteopontin, macrophages and endothelial cell densities were not significantly different in animals with or without AS (Fig. 5D–I).

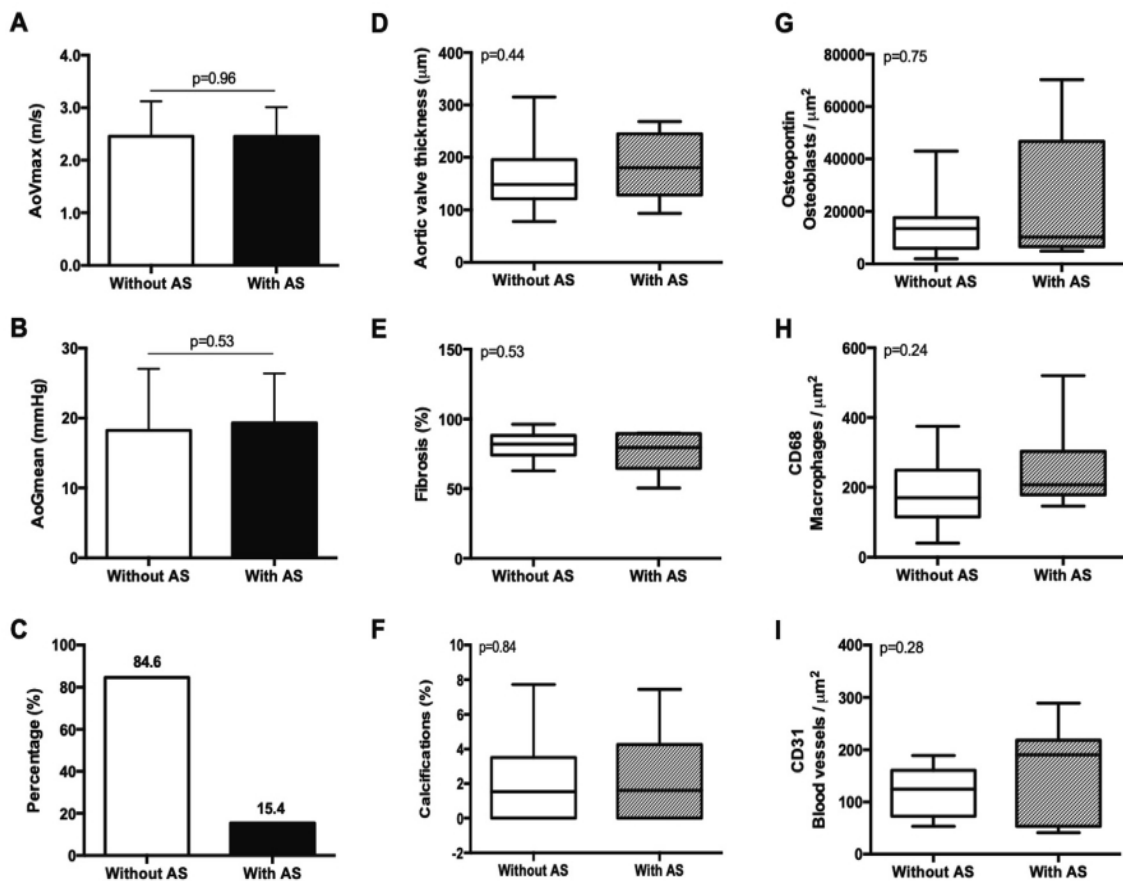
## 4. Discussion

As previously mentioned, experimental models developing AS-associated increases in transaortic mean gradient and valvular calcification are lacking, though various animal models have been proposed. Whereas some species, such as swine, can develop spontaneous aortic valve calcification, others, such as rabbits and mice, have not been shown to develop AS naturally and require at least one external factor, such as hypercholesterolemia [7]. Therefore, diet-induced and genetic models in mice and rabbits were proposed, but none of these models have been able to mimic human AS [6]. Indeed, these animals are mainly atherosclerotic models, deficient in apolipoprotein E (ApoE<sup>-/-</sup>) and apolipoprotein B100 (ApoB<sup>100/100</sup>); only 30% of senile mice truly develop AS [20–22]. Recently, a model combining diabetogenic and procalcification diet in LDLr<sup>-/-</sup>/ApoB<sup>100/100</sup> has been proposed, but the model is time-consuming and is associated with a modest increase of mean aortic gradient [11,21]. A surgical AS model has been proposed, consisting of a valvular direct wire injury. However, this model is technically very difficult to reproduce and has not been used by other groups. Furthermore valvular injury may also induce AR [23].

In the past decade, a new genetically modified AS mouse model has been proposed. The waved-2 mouse consists of a single-nucleotide homozygous substitution mutation in the gene encoding epidermal EGFR, leading to a 90% reduction in EGFR-tyrosine kinase activity and valvular abnormalities including valve thickening, fibrosis, calcification and elevated transvalvular aortic gradient [8]. However, it has been recently shown that the waved-2 mouse model essentially mimics AR, and only a few animals develop pure severe AS [9]. Barrick et al. [8] confirmed that waved-2 mice had thickened, fibrotic and calcified valves but elegantly showed that aortic cusp separation, assessed by echocardiography, was not



**Fig. 4.** Immunofluorescence staining of waved-2 mouse aortic valve. (A, C and E) Examples of immunofluorescence stainings for osteogenic marker (osteopontin, red, A), inflammation (CD-68, green, C) and endothelial cells (CD-31, red, E) in control, 6-month treatment and 9-month treatment groups. (B, D and F) box plot representation of osteopontin (B), CD-68 (D), and CD-31 (F) positive cells in control ( $n = 12$ , white), 6-month treatment (gray,  $n = 16$ ) and 9-month treatment (black,  $n = 11$ ) groups.



**Fig. 5.** Comparison of animals with and without aortic stenosis (AS). Measurements of maximal aortic peak velocity (AoVmax, A), mean aortic gradient (AoGmean, B) and bar graph occurrence of moderate/severe aortic regurgitation (AR) (C) in C57BL/6J waved-2 mice with ( $n = 6$ ) and without ( $n = 33$ ) AS. Histology results (D–F): box plot representation of valve thickness (D), valve fibrosis (E), and calcification (F); the percentage represents the proportion of positive staining in waved-2 mice with ( $n = 6$ ) and without ( $n = 33$ ) AS. Immunohistochemical results (G–I): quantification of osteopontin (G), CD-68 (H), and CD-31 (I) positive cells in waved-2 mice with ( $n = 6$ ) and without ( $n = 33$ ) AS.



decreased, indicating the absence of AS in almost all the animals. Only 3 out of 55 waved-2 mice had true AS. Importantly, the increase in the transaortic gradient and peak jet velocity was not related to AS, but it was explained by an increased flow induced by AR. Furthermore, AS is thought to induce left ventricular hypertrophy, but waved-2 mice had left ventricular dilatation concordant with severe AR.

In an attempt to improve the waved-2 mouse model, we assessed the effect of HFD and vitamin D<sub>3</sub> supplementation, since it has been previously shown that HFD and vitamin D<sub>3</sub> supplementation induces vascular calcification in mice [16,17] and aortic valve calcification in rabbits [10,24,25]. In our preliminary study, the authors tested the optimal method of administering vitamin D<sub>3</sub>. In accordance with previous studies [13–15], the authors showed that intraperitoneal injection and subcutaneous injection of high dose of vitamin D<sub>3</sub> were well tolerated and increased 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and calcium levels in C57BL6/J mice. In contrast, gavage administration of vitamin D<sub>3</sub> had no effect. As expected, HFD increased serum levels of total cholesterol.

Despite vitamin D<sub>3</sub> supplementation and HFD, we did not observe any improvement in the waved-2 mouse model. Only six animals (four in the treatment groups and two in the control group) had severe AS. In the remaining animals, AR had been induced. Mean aortic gradient and transaortic peak velocity were similar in both groups and the presence of moderate to severe AR was not decreased by HFD and vitamin D<sub>3</sub> supplementation. Interestingly, despite increases in serum 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and cholesterol levels, the authors did not observe any increase of calcification, lipid deposition, expression of osteogenic markers or inflammation in aortic valves. On the other hand, the authors did not observe any significant variation of serum levels of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and cholesterol or morphological changes in aortic valves in animal with or without AS. Furthermore, we observed similar results at 9 months of age, suggesting no delayed effect of HFD and vitamin D<sub>3</sub> supplementation. The authors also attempted to evaluate the effect of a higher dose of vitamin D<sub>3</sub> injected subcutaneously, as previously reported [26]. Unfortunately, all mice died within 10 days and it is therefore unlikely that vitamin D<sub>3</sub> supplementation will have the desired effect in the waved-2 mouse model.

## 5. Conclusion

The results of our study suggest that vitamin D<sub>3</sub> supplementation and HFD did not improve the waved-2 mouse model. This model essentially induces AR and very rarely AS. It should not be used to evaluate new strategies to prevent AS progression. Further efforts are required to find a reliable animal model of AS.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Valery Brunel from the Department of General Biochemistry, Rouen University Hospital, for his analytical and biological expertise of animal models.

## Financial support

This work was supported by the French Government, managed by the National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’avenir” with the reference ANR-16-RHUS-0003 (RHU project “Search Treatment and Improve Outcome of Patients with Aortic Stenosis” (STOP-AS)—Hélène Eltchaninoff). Bérénice Colleville’s doctoral program was funded by the Fédération Hospitalo-Universitaire “Early markers of cardiovascular REMODEling in Valvulopathy and Heart Failure” (REMOD-VHF) and the Rouen Normandy University.

## Author contribution

BC, VR, HE, and ED designed the study. BC, PB and NP carried out the experiments. GA performed echocardiographic analysis. FZ performed serum blood analysis. AD contributed to histological analysis. BC, NP, and ED analyzed the data. All authors provide critical feedback and contributed to the final manuscript.

## Conflicts of interests

The authors have no potential conflicts of interest.

## References

- Varennes O, Six I, Mentaverri R, Kamel S. Mécanismes physiopathologiques du rétrécissement aortique calcifié. *Revue Francophone des Laboratoires* 2017;2017(493):25–32 [French with abstract in English].
- Eveborn GW, Schirmer H, Lunde P, Heggelund G, Hansen JB, Rasmussen K. Assessment of risk factors for developing incident aortic stenosis: the Tromsø Study. *Eur J Epidemiol* 2014;29(8):567–75.
- Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, De Bonis M, Hamm C, Holm PJ, et al. 2017 ESC/EACTS guidelines for the management of valvular heart disease. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2018;71(2):110.
- Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: a review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive Summary: calcific aortic valve disease—2011 update. *Circulation* 2011;124(16):1783–91.
- Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circ Res* 2011;108(11):1392–412.
- Sider KL, Blaser MC, Simmons CA. Animal models of calcific aortic valve disease. *Int J Inflamm* 2011;2011:364310.
- Guerraty M, Mohler Iii ER. Models of aortic valve calcification. *J Investig Med* 2007;55(6):278–83.
- Barrick CJ, Roberts RB, Rojas M, Rajamannan NM, Suitt CB, O’Brien KD, et al. Reduced EGFR causes abnormal valvular differentiation leading to calcific aortic stenosis and left ventricular hypertrophy in C57BL/6j but not 129S1/SvImj mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297(1):H65–75.
- Hajj GP, Chu Y, Lund DD, Magida JA, Funk ND, Brooks RM, et al. Spontaneous aortic regurgitation and valvular cardiomyopathy in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35(7):1653–62.
- Drolet MC, Arsenault M, Couet J. Experimental aortic valve stenosis in rabbits. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(7):1211–7.
- Scatena M, Jackson MF, Speer MY, Leaf EM, Wallingford MC, Giachelli CM. Increased calcific aortic valve disease in response to a diabetogenic, procalcific diet in the LDLr<sup>-/-</sup> ApoB<sup>100/100</sup> mouse model. *Cardiovasc Pathol* 2018;34:28–37.
- Roosens B, Droogmans S, Hostens J, Somja J, Delvenne E, Hernot S, et al. Integrated backscatter for the *in vivo* quantification of supraphysiological vitamin D<sub>3</sub>-induced cardiovascular calcifications in rats. *Cardiovasc Toxicol* 2011;11(3):244–52.
- Chun RF, Hernandez I, Pereira R, Swinkles L, Huijs T, Zhou R, et al. Differential responses to vitamin D<sub>2</sub> and vitamin D<sub>3</sub> are associated with variations in free 25-hydroxyvitamin D. *Endocrinology* 2016;157(9):3420–30.
- Crocker JF, Muhtadie SF, Hamilton DC, Cole DE. The comparative toxicity of vitamin D metabolites in the weanling mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;80(1):119–26.
- Sergeev IN, Song Q. High vitamin D and calcium intakes reduce diet-induced obesity in mice by increasing adipose tissue apoptosis. *Mol Nutr Food Res* 2014;58(6):1342–8.
- Roosens B, Bala G, Droogmans S, Van Camp G, Breyne J, Cosyns B. Animal models of organic heart valve disease. *Int J Cardiol* 2013;165(3):398–409.
- Drolet MC, Roussel E, Deshaies Y, Couet J, Arsenault M. A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6j mice. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(4):850–5.
- Valcour A, Zierold C, Podgorski AL, Olson GT, Wall JV, DeLuca HF, et al. A novel, fully-automated, chemiluminescent assay for the detection of 1,25-dihydroxyvitamin D in biological samples. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016;164:120–6.
- Henri O, Poueche C, Houssari M, Galas L, Nicol L, Edwards-Lévy F, et al. Selective stimulation of cardiac lymphangiogenesis reduces myocardial edema and fibrosis leading to improved cardiac function following myocardial infarction. *Circulation* 2016;133(15):1484–97. discussion 1497.
- Tanaka K, Sata M, Fukuda D, Suematsu Y, Motomura N, Takamoto S, et al. Age-associated aortic stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Am Coll Cardiol* 2005;46(1):134–41.
- Le Quang K, Bouchareb R, Lachance D, Laplante MA, El Husseini D, Boulanger MC, et al. Early development of calcific aortic valve disease and left ventricular hypertrophy in a mouse model of combined dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(10):2283–91.
- Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, Young SG, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice. *Circulation* 2006;114(19):2065–9.



- [23] Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, Narumi T, Kadowaki S, Honda Y, et al. A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(2):270–8.
- [24] Ngo DT, Stafford I, Kelly DJ, Sverdlov AL, Wuttke RD, Weedon H, et al. Vitamin D(2) supplementation induces the development of aortic stenosis in rabbits: interactions with endothelial function and thioredoxin-interacting protein. *Eur J Pharmacol* 2008;590(1–3):290–6.
- [25] Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Atkinson J. Aortic calcification produced by vitamin D<sub>3</sub> plus nicotine. *J Vasc Res* 1997;34(5):386–98.
- [26] Xu R, Zhao M, Yang Y, Huang Z, Shi C, Hou X, et al. MicroRNA-449c-5p inhibits osteogenic differentiation of human VICs through Smad4-mediated pathway. *Sci Rep* 2017;7(1):8740.

## Étude 2

Rôle du système endothélinergique dans la calcification valvulaire aortique humaine.

### Résultats de l'étude 2

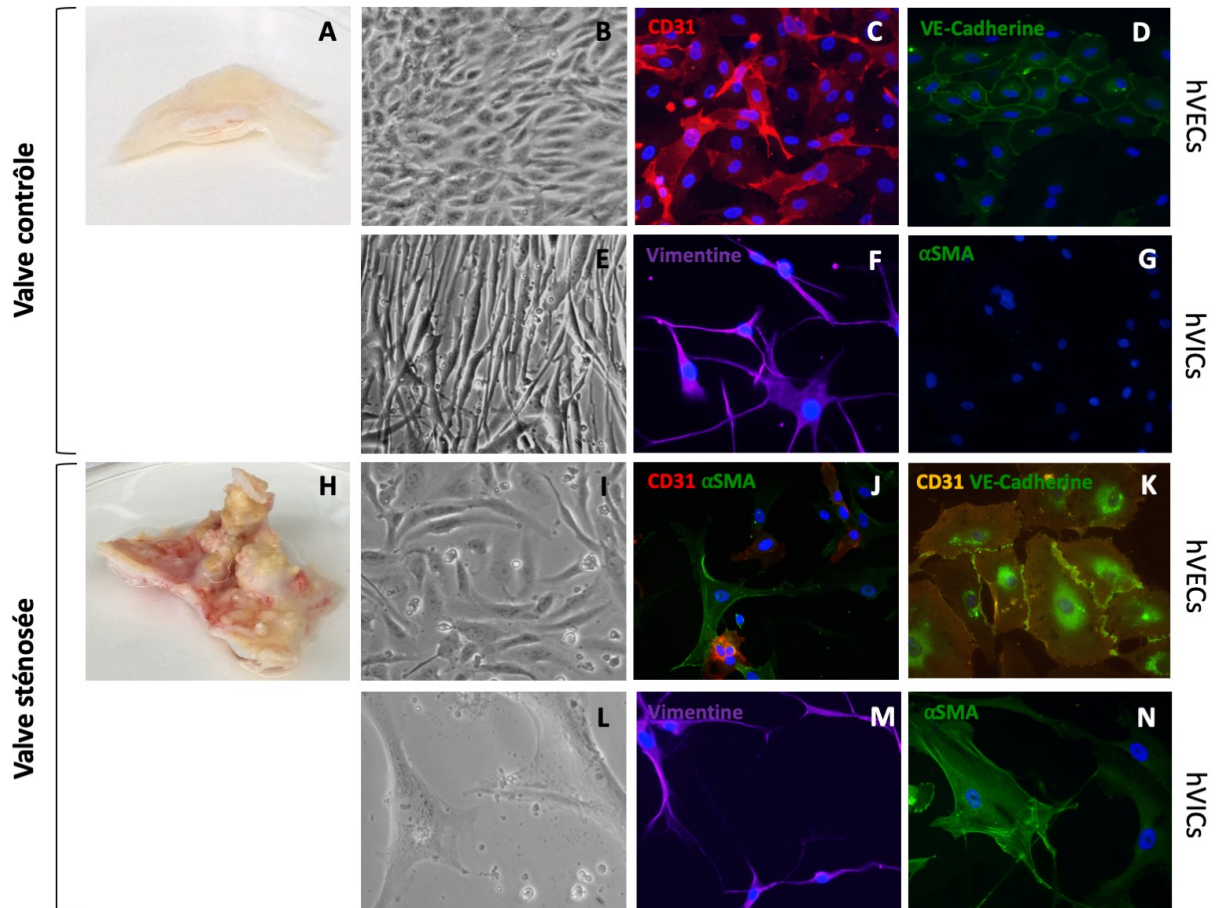
Cette thématique étant nouvelle dans le laboratoire, la première étape de cette étude a donc été de mettre au point la méthodologie nécessaire à sa réalisation. Ainsi, nous avons dans un premier temps mis au point l'isolation et la culture primaire des cellules valvulaires humaines, puis caractérisé leurs phénotypes et optimisé leurs conditions de culture dans un milieu pro-calcifiant. Pour évaluer la production de calcium, nous avons utilisé un dosage quantitatif colorimétrique au o-crésolphthaléine.

#### Caractérisation des cellules endothéliales et interstitielles valvulaires humaines

Les cellules endothéliales et interstitielles valvulaires (hVECs et hVICs) ont été isolées à partir de valves aortiques humaines comme décrit précédemment dans *le chapitre II, partie VI*. Les valves aortiques « sans rétrécissement aortique calcifié » ont été obtenues chez des patients ayant été traités par une intervention de Bentall (remplacement de la valve aortique et de l'aorte ascendante par un tube valvé). Ces valves étaient dépourvues de calcifications et étaient considérées comme contrôles (figure 32A). Les valves avec rétrécissement aortique proviennent de patients ayant un RA serré et traités par remplacement valvulaire aortique. Ces valves qui avaient des calcifications importantes étaient considérées comme sténosées (figure 32H).

En culture primaire, les hVECs présentent une morphologie prismatique typique des cellules endothéliales et poussent en amas cellulaires pour favoriser la croissance (figure 32 B et I), tandis que les hVICs présentent une morphologie semblable à celle des myofibroblastes sous forme de fuseau (figure 32 E et L).

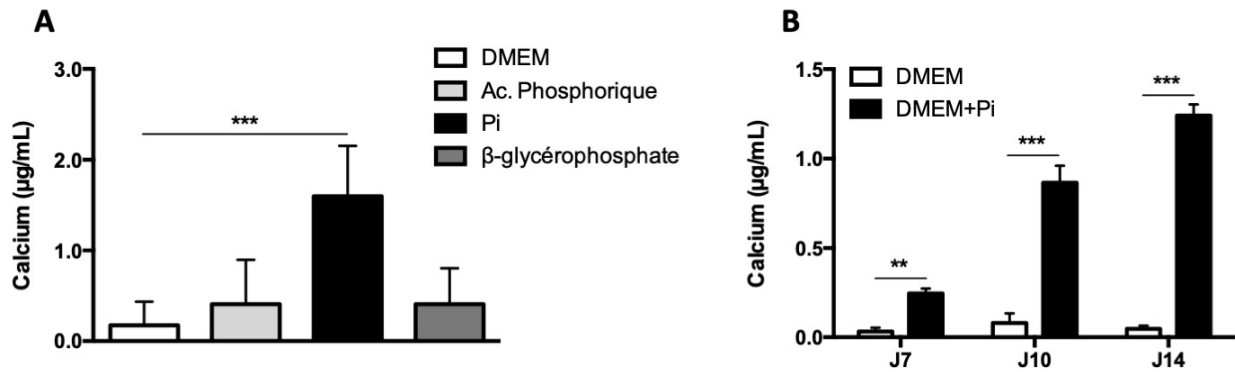
Les marquages immunocytochimiques ont permis de montrer que les hVECs sont positives pour le marqueur endothélial CD31 (figure 32 C, J et K) et pour le marqueur des jonctions adhérentes VE-Cadhérine (figure 32D). Cependant, lorsque les hVECs sont issues d'une valve sténosée, elles perdent leurs jonctions et commencent à exprimer l' $\alpha$ SMA (figure 32 J et K). Les hVICs sont quant à elles des cellules qui expriment la vimentine, un marqueur des filaments intermédiaires (figure 32 F et M). Cependant, lorsqu'elles sont issues d'une valve sténosée, elles expriment l' $\alpha$ SMA, un marqueur des filaments d'actine (figure 32 G et N).



**Figure 32 : Caractérisation du phénotype des hVECs et des hVICs.** Valve aortique humaine contrôlée (A) et sténosée (H). Marquages immunocytochimiques des hVECs issues d'une valve contrôlée (B-D) ou sténosée (I-K) et des hVICs issues d'une valve contrôlée (E-G) ou sténosée (L-N). Immunocytochimie des hVECs : CD31 (rouge et orange) (C, J, K) ; VE-Cadherine (vert) (D et K) ; et des hVICs : vimentine (violet) (F, M) et  $\alpha$ SMA (vert) (J, N).

### Optimisation du milieu pro-calcifiant

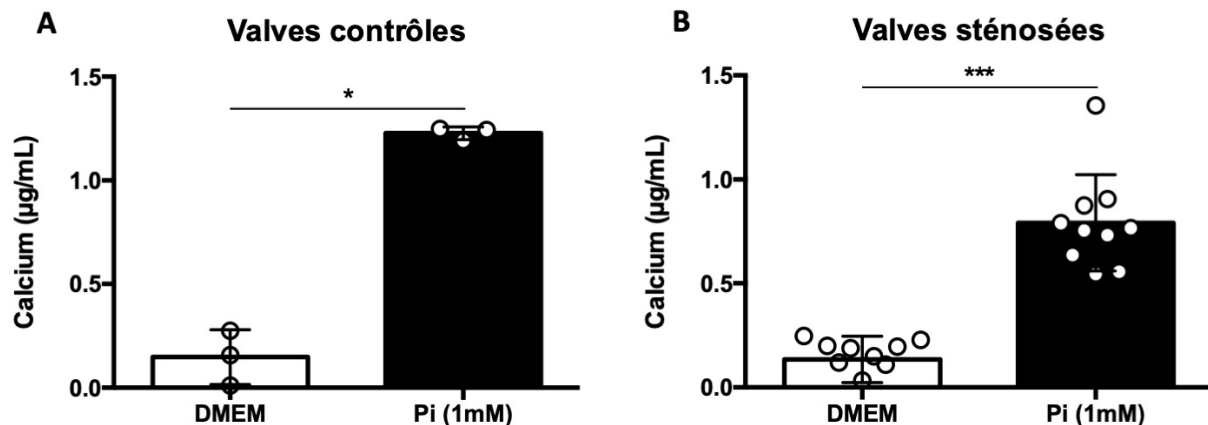
Nous avons tout d'abord cherché à montrer que les hVICs sont des cellules capables de calcifier *in vitro*. Pour ce faire, nous avons testé plusieurs agents pro-calcifiants (acide phosphorique, phosphate inorganique et  $\beta$ -glycérophosphate). Le phosphate inorganique (Pi) s'est avéré être le meilleur agent chimique induisant la calcification des hVICs (figure 33A). Une cinétique de culture contenant du Pi (1mM) a ensuite été réalisée sur plusieurs jours. Les résultats ont permis de montrer que la calcification des cellules est significativement augmentée lorsque les cellules sont cultivées en présence de Pi, et qu'elle augmente dans le temps (figure 33B). Cependant, en raison de la confluence des cellules trop importante à 14 jours, nous avons retenu la condition à 10 jours pour la suite des protocoles.



**Figure 33 : Choix et optimisation du milieu pro-calcifiant.** (A) Concentration en calcium dans le milieu de culture en fonction de l'agent pro-calcifiant. (B) Cinétique en réponse au Pi (1mM) à 7, 10 et 14 jours. Moyenne ± écart-type, n=3, \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

### Quantification du calcium dans les hVICs issues de valves contrôles et sténosées

La calcification des hVICs a été quantifiée par dosage colorimétrique au o-crésolphthaléine. Le calcium a été dosé dans des cultures primaires de hVICs incubées en présence du Pi (1mM). Nous avons observé une augmentation significative de la calcification à la fois dans les hVICs issues de valves dépourvues ou possédant un RAC (figure 34). Cependant, l'effet du Pi sur la calcification des hVICs semble moins important dans les valves sténosées.



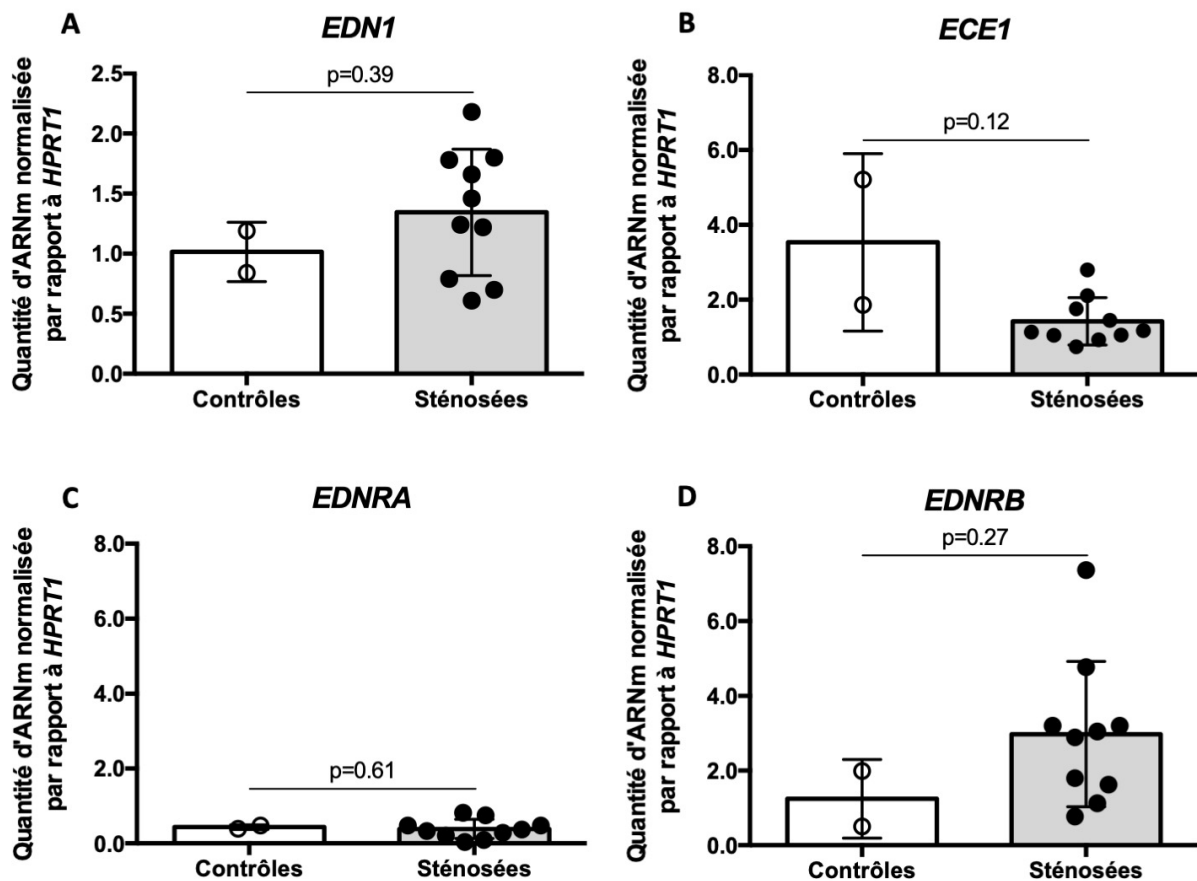
**Figure 34 : Quantification de la concentration en calcium dans les hVICs.** Dépôts calciques dans les hVICs issues de valves contrôles (A) ou sténosées (B) après 10 jours de culture dans un milieu pro-calcifiant (Pi 1mM). Moyenne ± écart-type ; n<sub>Contrôles</sub> = 3 ; n<sub>Sténosées</sub> = 10 ; \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Initialement considéré comme une dégénérescence passive de la valve aortique, le RAC est aujourd'hui décrit comme un processus actif et hautement régulé qui s'accompagne de changements dans l'expression de nombreux gènes, et notamment dans les gènes liés à l'endothéline<sup>103</sup>. Dans cette étude, nous avons tout d'abord comparé l'expression des gènes du système endothélinergique entre les valves contrôles et les valves sténosées. Nous nous avons ensuite étudié l'effet de l'endothéline-1 (ET-1) dans des cultures primaires de hVICs.

### Expression des gènes liés à l'endothéline dans les hVECs dans les valves contrôles et sténosées

Des PCR quantitatives ont été réalisées afin de déterminer l'expression des gènes liés à l'endothéline dans les hVECs issues de valves contrôles (n=2) et sténosées (n=10).

L'analyse des résultats a montré par rapport aux valves non sténosées une augmentation non significative de l'expression de l'ET-1 dans les hVECs des valves sténosées associée à une diminution non significative de l'expression de l'ECE1, l'enzyme de conversion permettant la libération de la forme mature et active de l'ET-1 (figure 35 A et B). Concernant les récepteurs, nous n'avons pas retrouvé d'expression du récepteur à l'endothéline de type A dans les hVECs dans les valves contrôles et dans les valves sténosées (figure 35C). En revanche, les hVECs expriment le récepteur de type B (figure 35D). De plus, nous avons pu observer une augmentation non significative de l'expression du récepteur de type B dans les hVECs issues de valves sténosées. L'absence de significativité est en grande partie expliquée par le manque de puissance de nos effectifs, notamment pour les valves non sténosées.



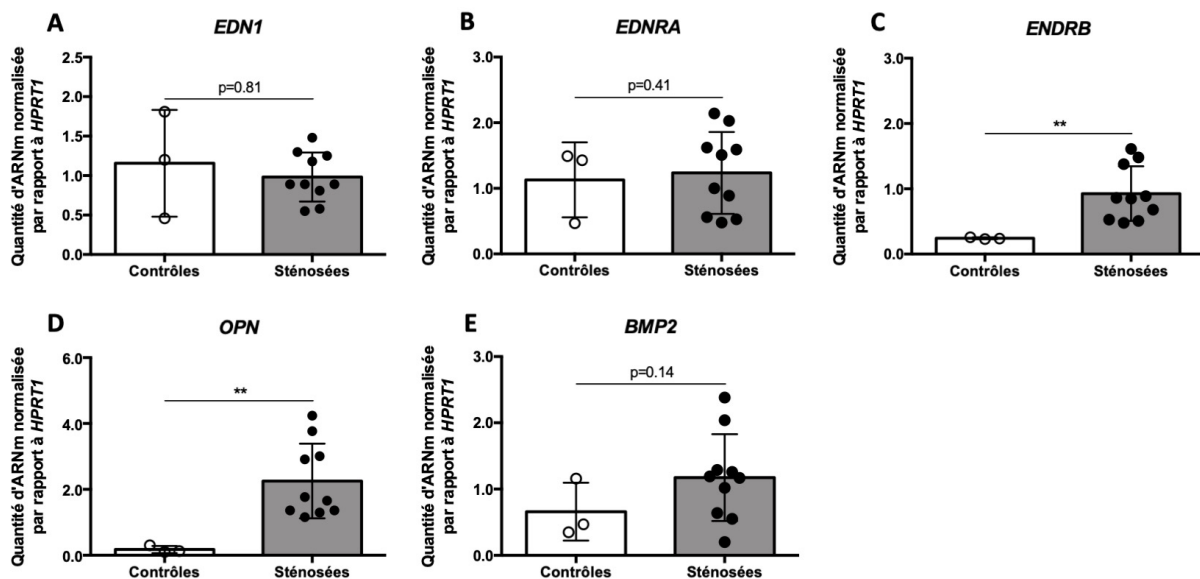
**Figure 35 :** Niveau d'expression génique de l'endothéline-1 et des gènes associés dans les hVECs. Niveau d'expression de l'endothéline-1 (ET-1) (*EDN1*) (A), de l'enzyme de conversion de l'ET-1 (*ECE1*) (B), du récepteur à l'ET-1 de type A (*EDNRA*) (C) et du récepteur à l'ET-1 de type B (*EDNRB*) (D) dans les hVECs issues de valves contrôles ou sténosées. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un rapport de l'ARNm sur le gène de ménage *HPRT1*.

Moyenne ± écart-type ; n<sub>Contrôles</sub> = 2 ; n<sub>Sténosées</sub> = 10.

### Expression des gènes liés à l'endothéline et de la calcification dans les hVICs dans les valves contrôles et sténosées

Des PCR quantitatives ont été réalisées afin de déterminer l'expression des gènes liés à l'endothéline et de la calcification dans les hVICs issues de valves contrôles (n=3) et sténosées (n=10).

Les analyses par PCR quantitative en temps réel ont dans un premier temps permis de montrer que les deux sous-types de récepteurs à l'ET-1 sont exprimés dans les hVICs. Le niveau d'expression du récepteur ET<sub>A</sub> reste inchangé entre les hVICs issues de valves avec ou sans RAC (figure 36B). De façon intéressante, nous avons pu observer que le récepteur ET<sub>B</sub> était exprimé dans les hVICs chez les patients ayant des valves sténosées alors que nous pensions que ce récepteur n'était exprimé que dans les cellules endothéliales (figure 36C). L'analyse de l'expression des gènes de la calcification a montré une augmentation significative du niveau d'expression de l'ostéopontine (*OPN*) dans les valves sténosées et une augmentation non significative de BMP2, un marqueur de la différenciation ostogénique des hVICs (figure 36 D et E). L'absence de significativité est en grande partie expliquée par le manque de puissance de nos effectifs, notamment pour les valves non sténosées.



**Figure 36 :** Niveau d'expression des gènes liés à l'endothéline et de la calcification dans les hVICs.

Niveau d'expression des récepteurs à l'ET-1 (*EDN1*) (A), du récepteur à l'ET-1 de type A (*EDNRA*) (B), du récepteur à l'ET-1 de type B (*EDNRB*) (C) et des gènes de la calcification (*OPN* et *BMP2*) (D, E) dans les hVICs issues de valves contrôles ou sténosées. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un rapport de l'ARNm sur le gène de ménage *HPRT1*.

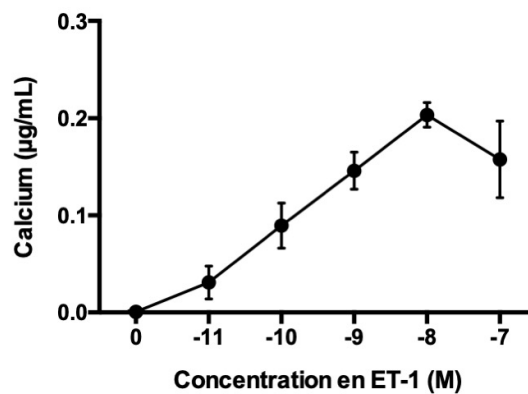
Moyenne ± écart-type ; n<sub>Contrôles</sub> = 3 ; n<sub>Sténosées</sub> = 10 ; \*\*P < 0,01.

### Effet de l'endothéline-1 sur la calcification

Dans le laboratoire, nous avons fait l'hypothèse que le système endothélinergique pourrait jouer un rôle dans la calcification valvulaire aortique. Dans cette étude nous avons tout d'abord évalué l'effet de l'endothéline-1 (ET-1) sur la calcification des hVICs en culture primaire.

### Courbe dose-réponse à l'endothéline-1

Nous avons réalisé une courbe dose-réponse avec des concentrations croissantes d'ET-1 dans des cultures primaires de hVICs issues de valves sténosées. Nous avons observé une production de calcification proportionnelle à la dose d'ET-1 avec un effet maximal à  $10^{-8}$ M. Cependant, pour des concentrations plus fortes, au-delà de  $10^{-8}$ M, l'action de l'ET-1 semble diminuer avec une production décroissante du calcium. Ainsi, en accord avec la littérature, nous avons retenu la dose de  $10^{-9}$ M comme concentration optimale pour promouvoir la calcification des hVICs *in vitro* et pour la suite des expérimentations (figure 37).

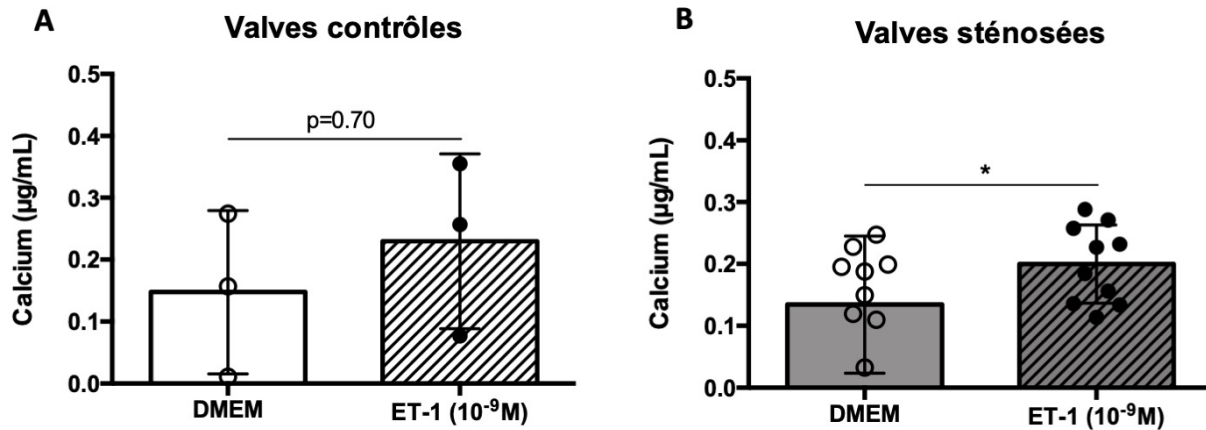


**Figure 37** : Courbe dose-réponse à l'endothéline-1.  
Moyenne ± écart-type ; n = 4.

### Quantification du calcium dans les hVICs incubées avec de l'ET-1

Les hVICs ont été cultivées pendant 10 jours avec de l'ET-1 ( $10^{-9}$ M), où l'ET-1 a été renouvelée tous les jours. Pour visualiser l'effet de l'ET-1 sur la calcification valvulaire, le calcium a été dosé dans les cultures de hVICs. Les résultats obtenus ont montré une augmentation significative de la quantité de calcium dans les cultures de hVICs issues de valves sténosées. Dans les valves contrôles, nous avons pu observer une augmentation non significative de la calcification (figure 38). Cependant, l'évaluation de l'effet de l'ET-1 dans les valves sténosées est limitée par le faible effectif de ce groupe (n=3).





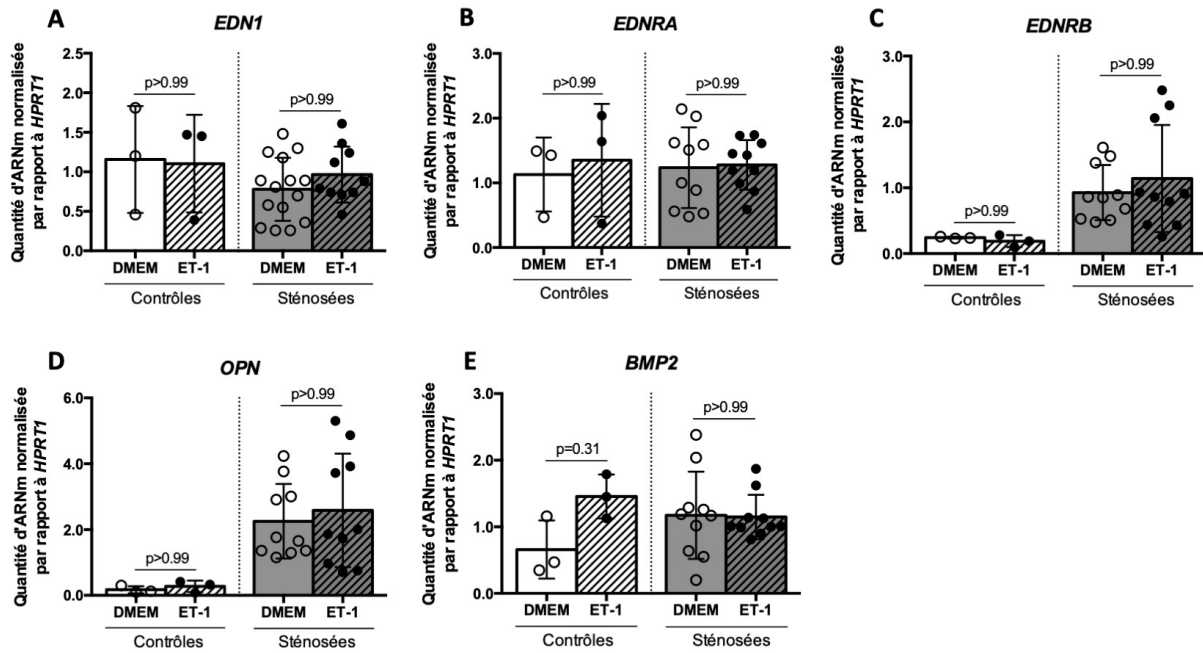
**Figure 38** : Quantification de la concentration en calcium dans les hVICs incubées avec de l'ET-1. Dépôts calciques dans les hVICs issues de valves contrôles (A) ou sténosées (B) après 10 jours de culture dans un milieu supplémenté en endothéline-1 (10<sup>-9</sup>M). Moyenne±écart-type ; n<sub>Contrôles</sub> = 3 ; n<sub>Sténosées</sub> = 10 ; \*P < 0,05.

### Expression des gènes liés à l'endothéline et de la calcification et les hVICs incubées avec ou sans ET-1

Des PCR quantitatives ont été réalisées afin de déterminer l'expression des gènes liés à l'endothéline et de la calcification dans les hVICs issues de valves contrôles (n=3) et sténosées (n=10) incubées ou non avec de l'ET-1 10<sup>-9</sup>M.

L'ajout d'ET-1 dans le milieu de culture n'a également pas eu d'impact sur son expression génique dans les valves contrôles et sténosées (figure 39A). Concernant ses récepteurs, nous n'avons pas observé de changement dans l'expression du récepteur de type A et de type B sous l'effet d'ET-1 (figure 39 B et C). Comme précédemment, nous avons retrouvé une surexpression significative du récepteur de type B dans les hVICs issues de valves sténosées par rapport aux valves contrôles (figure 39C). L'analyse de l'expression des gènes de la calcification, a montré une surexpression l'ostéopontine (*OPN*) dans les valves sténosées (figure 39 D) mais pas de variation significative de BMP2 entre les valves contrôles et sténosées (figure 39E). Par ailleurs, l'ET-1 n'a pas eu d'effet sur l'expression des gènes de la calcification des hVICs qui n'a pas augmenté par rapport aux cellules qui ont été cultivées dans des conditions standards ; cependant, nous avons pu observer une augmentation non significative de l'expression de BMP2 avec l'ET-1 dans les valves contrôles (figure 39 D et E).

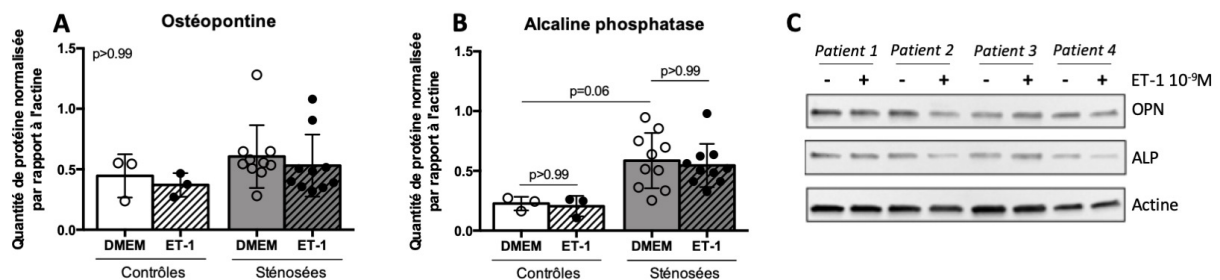




**Figure 39 :** Niveau d'expression des gènes liés à l'endothéline et de la calcification dans les hVICs incubées avec ou sans endothéline-1. Niveau d'expression des récepteurs à l'ET-1 (*EDN1*) (A), du récepteur à l'ET-1 de type A (*EDNRA*) (B), du récepteur à l'ET-1 de type B (*EDNRB*) (C) et des gènes de la calcification (*OPN* et *BMP2*) (D, E) dans les hVICs issues de valves contrôles ou sténosées cultivées en présence ou non d'ET-1 ( $10^{-9}$ M). Les résultats sont exprimés sous la forme d'un rapport de l'ARNm sur le gène de ménage *HPRT1*. Moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n_{\text{Contrôles}} = 3$  ;  $n_{\text{Sténosées}} = 10$ .

### Analyse protéique de la calcification dans les hVICs

L'analyse par western blot a permis de quantifier l'expression protéique de l'ostéopontine et de la phosphatase alcaline. Les résultats n'ont pas permis de montrer une augmentation de l'activité protéique de l'ostéopontine dans les valves sténosées, même lorsqu'elles étaient incubées avec de l'ET-1. En revanche, l'activité protéique de l'alcaline phosphate été augmentée dans les valves sténosées par rapport aux valves contrôles. Cependant, l'ET-1 n'a pas induit de changement de son activité (figure 40).



**Figure 40 :** Activité protéique de l'ostéopontine et de la phosphatase alcaline dans les hVICs. (A) Ostéopontine, (B) Phosphatase alcaline, (C) Western blot. Moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n_{\text{Contrôles}} = 3$  ;  $n_{\text{Sténosées}} = 10$ .

## Discussion de l'étude 2

D'après les données existantes de la littérature concernant la physiopathologie du RAC, nous avons fait l'hypothèse que la dysfonction endothéliale valvulaire jouait un rôle clé dans l'initiation et la progression de la maladie.

Dans la valve aortique saine, les feuillets valvulaires sont recouverts sur leurs deux versants (aortique et ventriculaire) par des cellules valvulaires endothéliales (VECs) qui ont un rôle protecteur sur les cellules valvulaires interstitielles (VICs). Dans les conditions normales, comme au niveau des vaisseaux, les VECs forment une barrière imperméable évitant les contacts entre le sang et le contenu valvulaire ; et synthétisent des peptides vasoactifs comme le NO et l'endothéline-1 (ET-1). Au stade initial de la maladie, de façon similaire à l'athérosclérose vasculaire, cette barrière imperméable est altérée par des microtraumatismes favorisant l'infiltration lipidique, l'inflammation et la différenciation des VICs entraînant le remodelage fibrocalcique de la valve<sup>62-64</sup>. Il a été récemment démontré que ces microfissures permettent le passage des globules rouges, activant l'inflammation et la production de calcium par les VICs<sup>68</sup>. D'autre part, nous pensons que cette dysfonction endothéliale peut être impliquée dans la progression de la maladie par l'intermédiaire de la modification de la sécrétion de peptides vasoactifs tel que l'ET-1.

Notre laboratoire est actuellement impliqué dans le workpackage 2 du RHU STOP-AS qui a pour but de mieux comprendre la physiopathologie du RAC et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour ralentir ou stopper la progression de cette maladie. Notre équipe est plus particulièrement impliquée dans les études concernant l'effet de protecteurs endothéliaux. Les résultats de ce travail portent sur nos premières investigations concernant le système endothélinergique.

Dans les conditions physiologiques, l'ET-1 est produite en faibles concentrations par les cellules endothéliales. L'ET-1 agit de façon autocrine et paracrine sur ses deux sous-types de récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub><sup>106,107</sup>. En outre, dans le système vasculaire, le récepteur ET<sub>A</sub> est à l'origine de la vasoconstriction des vaisseaux *via* la libération intracellulaire de calcium<sup>106,107</sup>, tandis que le récepteur ET<sub>B</sub> est responsable de la vasodilatation indirecte des cellules musculaires lisses grâce à des médiateurs tels que le NO et la prostacycline<sup>107,109</sup>. Le rôle précis de ces deux récepteurs est actuellement inconnu dans le rétrécissement aortique.

Dans le but d'étudier la calcification valvulaire, nous avons mené notre étude sur des cellules valvulaires interstitielles (hVICs) et endothéliales (hVECs) isolées à partir de valves de patients ayant bénéficié d'un remplacement valvulaire aortique (valves sténosées) ou une chirurgie de type Bentall (valves contrôles, considérées saines). Comme précédemment décrit par *Gould et coll.*, nous avons différencié et caractérisé les différentes populations cellulaires de la valve<sup>142</sup>. Le phénotype des hVECs a été confirmé par la présence du marqueur endothélial CD31 et de la VE-Cadhérine dans les cellules issues de valves contrôles. Il a été décrit dans le RAC que l'homéostasie VEC-VIC est perturbée et ainsi que les VECs peuvent se différencier en VIC *via* la transition endothélio-mésenchymateuse, perdant ainsi l'expression de la VE-Cadherine pour exprimer l' $\alpha$ SMA<sup>143</sup>. Après isolation des hVECs, les hVICs sont facilement recueillies et caractérisées. Lors de l'ostéogenèse valvulaire, les qVICs se différencient en aVICs de type myofibroblastique et sont responsables du remodelage de la MEC. Ainsi, les hVICs sont identifiées par leur phénotype  $\alpha$ SMA et vimentine positif dans les cellules issues des valves sténosées<sup>143</sup>.

Il a déjà été démontré dans de nombreuses études *in vitro*, notamment menées sur les VICs de porc, que la présence d'un agent pro-calcifiant est nécessaire pour étudier la calcification des VICs<sup>143,144</sup>. Notre étude préliminaire nous a ainsi permis de montrer dans un premier temps que les VICs isolées à partir de valves aortiques humaines sont capables de calcifier *in vitro* lorsqu'elles sont cultivées en présence de Pi (1 mM).

Le système endothélinergique est impliqué dans de nombreux processus physiopathologiques et notamment dans les calcifications vasculaires<sup>109,111</sup>. En effet, des études ont montré que la calcification vasculaire est associée à une augmentation de la production d'ET-1 *via* l'activation de son récepteur de type A<sup>145,146</sup>. Cependant, le système endothélinergique a été très peu étudié dans le RAC. *Peltonen et coll.* ont étudié par immunohistochimie (IHC) et par qRT-PCR le rôle de l'ET-1 et de ses récepteurs dans des valves saines et pathologiques. Ils ont rapporté une augmentation de l'ET-1 dans les valves sténosées par IHC, mais n'ont pas retrouvé d'augmentation de son expression génique. L'ET-1 était détectée au niveau de l'endothélium et au sein des valves. Le récepteur de type A était augmenté dans les valves sténosées ainsi que son ARNm. En revanche, ils n'ont pas retrouvé de variation de l'expression des récepteurs de type B qui étaient présents uniquement au niveau de l'endothélium. Il a également été rapporté dans des valves explantées, une absorption plus importante de l'ET-1 dans les zones valvulaires calcifiées par rapport à des valves macroscopiquement saines<sup>116</sup>.

Dans notre étude, nous avons retrouvé des résultats sensiblement différents. Contrairement à l'étude de *Peltonen et coll.* qui était réalisée sur l'ensemble du tissu valvulaire, nous avons étudié le système endothélinergique dans des cultures primaires de hVICs et de hVECs par qRT-PCR. Par rapport aux valves contrôles, nous avons retrouvé dans les hVECs une augmentation non significative du gène codant pour l'ET-1, et une augmentation non significative du gène codant pour son récepteur de type B. Dans les hVICs, nous n'avons pas retrouvé d'augmentation de l'expression du gène de l'ET-1, ni de variation de l'expression génique du récepteur de type A. Cependant, nous avons retrouvé une augmentation significative de l'expression du récepteur de type B. Ainsi, comme dans l'étude de *Peltonen et coll.*, nous n'avons pas retrouvé de surexpression du gène codant pour l'ET-1 et du récepteur de type A dans les hVICs issues des valves sténosées. De plus, nous avons retrouvé une surexpression du gène codant pour le récepteur de type B dans les hVECs et les hVICs dans les valves sténosées, alors qu'il n'y avait pas de variation de ce récepteur dans les travaux menés par *Peltonen et coll.* Cette surexpression du récepteur de type B au niveau des hVICs pourrait s'expliquer par la transition endothélio-mésenchymateuse (TEM) des VECs. En effet, au cours de l'ostéogenèse valvulaire, les interactions VICs-VECs sont perturbées et les VICs n'exercent plus d'inhibition sur la TEM des VEC. Ainsi, les VECs se différencient en VICs puis en VICs de type ostéoblastique et contribuent ainsi à la calcification valvulaire<sup>143</sup>, ainsi la surexpression d'ET<sub>B</sub>-R dans les hVICs serait corrélée à celle dans les hVECs. Nous pouvons également faire l'hypothèse que l'augmentation de l'expression du récepteur de type B est une conséquence de l'augmentation d'expression de l'ET-1 dans les hVECs, le récepteur de type B étant impliqué soit pour contrebalancer la stimulation des récepteurs de type A et/ou pour favoriser la clairance de l'ET-1. De plus, dans de nombreuses maladies associées à une dysfonction endothéliale, la diminution de la densité des récepteurs ET<sub>B</sub> est associée à une diminution de la clairance de l'ET-1<sup>106,107,111</sup>. Enfin, dans les deux études, il a été retrouvé une diminution de l'expression génique de l'enzyme de conversion de l'ET-1 dans les valves sténosées, probablement par rétrocontrôle négatif.

À notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir évalué l'effet de l'ET-1 dans des cultures primaires de cellules valvulaires. Nous avons observé que des concentrations croissantes d'ET-1 entraînaient une production croissante de calcium par les hVICs, qu'elles soient issues de valves sténosées ou non sténosées. Cependant, nous avons observé une ébauche de courbe en cloche pour des concentrations supérieures à 10<sup>-8</sup>M. Nous avons ensuite évalué l'effet de l'ET-1 sur l'expression des gènes du système endothélinergique dans des valves

contrôles et sténosées. Nous n'avons pas observé de variation de l'expression des gènes du système endothélinergique dans les valves contrôles et sténosées. Nous n'avons pas non plus observé de variation des gènes impliqués dans les processus de calcification (ostéopontine, BMP2). Ces résultats peuvent s'expliquer par l'analyse de l'expression génique tardive effectuée à 10 jours. En effet, les processus d'inflammation et de calcification du RAC font suite aux lésions de l'endothélium et font donc partis des mécanismes précoces de l'initiation de la sténose aortique<sup>69,70</sup>. En effet, un des mécanismes impliqués dans la physiopathologie du RAC est la différenciation des VICs en cellules de type ostéoblastiques<sup>92</sup>. De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans la différenciation ostéogénique de VICs, impliquant une multitude de médiateurs de la calcification dont l'expression peut être augmentée par de nombreux stimuli telles que les cytokines pro-inflammatoires<sup>71,93</sup>. Ainsi, au vu de la calcification qu'il est possible de détecter dès le dixième jour de culture, il serait intéressant d'effectuer une analyse plus précoce de l'expression génique de ces gènes.

Afin de reproduire les conditions physiologiques et de montrer le rôle de la dysfonction endothéliale, nous souhaiterions tester des antagonistes des récepteurs à l'ET-1 dans des co-cultures de hVICs et de hVECs contrôles et sténosées. Nos résultats préliminaires ont permis de montrer que lorsque des hVECs contrôles sont co-cultivées avec des hVICs issues de valves sténosées, la calcification est alors diminuée par rapport à une co-culture de cellules valvulaires pathologiques. Ces premiers résultats renforcent l'idée que l'endothélium, et potentiellement le système endothélinergique, pourrait avoir un impact sur la calcification valvulaire aortique. Ces données suggèrent ainsi que des antagonistes de l'ET-1 pourraient être utilisés dans ces systèmes afin ralentir la progression du RAC.

En conclusion, les résultats de cette étude ont permis de montrer que des hVICs en culture calcifient lorsqu'elles sont incubées avec de l'ET-1, suggérant l'implication du système endothélinergique dans les calcifications valvulaires aortiques. De plus, de façon très intéressante, la surexpression des récepteurs à l'endothéline de type B dans les hVECs et hVICs isolées à partir de valves sténosées indiquent qu'un antagoniste spécifique de ces récepteurs pourrait être une cible prometteuse pour le ralentissement de la progression des calcifications.

CHAPITRE IV  
*Conclusion & Perspectives*

---



Les deux principaux objectifs de ce travail étaient d'une part d'évaluer l'effet d'un régime enrichi en cholestérol et une supplémentation en vitamine D<sub>3</sub> dans le modèle *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* ; et d'autre part d'évaluer l'impact du système endothélinergique sur la calcification valvulaire.

Comme précédemment décrit, les modèles expérimentaux présentant un rétrécissement aortique calcifié avec sténose hémodynamiquement significative font défaut. Les résultats de notre étude *in vivo* n'ont pas permis de montrer qu'un régime enrichi en cholestérol et qu'une supplémentation en vitamine D<sub>3</sub> n'a pas permis d'améliorer le modèle *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>*. Ce modèle animal reste essentiellement un modèle d'insuffisance aortique, mais très rarement de rétrécissement aortique. Ainsi ce modèle ne pourra pas être utilisé pour évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le RAC.

Nous avons tenté d'évaluer l'effet de l'administration d'une forte dose de vitamine D<sub>3</sub> injectée par voie sous-cutanée chez des souris WT, comme rapportée dans l'étude de *Xu et coll.*<sup>147</sup>. Malheureusement, toutes les souris sont mortes dans les dix jours suivant l'injection, ne présument pas que la supplémentation en vitamine D<sub>3</sub> aura l'effet escompté dans le modèle *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>*. Nous avons également envisagé d'effectuer des croisements *ApoE<sup>-/-</sup>* et *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>*, cependant, les croisements n'ont donné aucune naissance homozygote pour les deux mutations, laissant supposer le caractère létal de cette double mutation. Enfin, nous envisageons d'effectuer des croisements de souris *Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup>* possédant un RAC entre elles dans l'optique de créer une lignée à caractère héréditaire du RAC.

Dans notre étude *in vitro* nous avons évalué l'effet de l'endothéline-1 (ET-1) sur la calcification des hVICs en culture primaire. Les résultats de cette étude ont permis de montrer que des hVICs en culture calcifient lorsqu'elles sont incubées avec de l'ET-1, suggérant l'implication du système endothélinergique dans les calcifications valvulaires aortiques. De manière très intéressante, cette étude a rapporté que le récepteur de type B est surexprimé à la fois dans les hVECs et hVICs issues de valves sténosées par rapport aux cellules issues des valves contrôles.

La surexpression des récepteurs de type B dans les cellules valvulaires indiquent qu'un antagoniste spécifique de ces récepteurs pourrait être une cible prometteuse pour le ralentissement de la progression des calcifications. Ainsi, pour mieux évaluer le rôle des récepteurs de type B dans les cellules valvulaires, à court terme nous envisageons d'étudier l'effet d'antagonistes mixtes et sélectifs des récepteurs à l'endothéline dans des co-cultures. À plus long terme, il serait intéressant d'étudier l'effet de ses antagonistes *in vivo* chez la souris.





# Valorisation scientifique

## Publications

B. Colleville, N. Perzo, G. Avinée, A. Dumesnil, F. Ziegler, P. Billoir, H. Eltchaninoff, V. Richard, E. Durand, *Impact of high-fat diet and vitamin D<sub>3</sub> supplementation on aortic stenosis establishment in waved-2 epidermal growth factor receptor mutant mice*, Journal of Integrative Medicine (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2019.01.010>

## Communications orales

Bérénice Colleville, Nicolas Perzo, Hélène Eltchaninoff, Vincent Richard, Eric Durand. *Implication of endothelin-1 in human aortic valve calcification*.  
3<sup>ème</sup> Journée FHU REMOD-VHF, à Rouen (76), 28 mars 2019

## Communications affichées

B. Colleville, N. Perzo, H. Eltchaninoff, V. Richard et E. Durand. *Implication of endothelin-1 in human aortic valve calcification*.

22<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique (SFPT), à Lyon (69), 12-14 juin 2019

14<sup>ème</sup> Édition du Printemps de la Cardiologie (SFC), à Lille (59), 1-3 avril 2019

3<sup>ème</sup> Journée FHU REMOD-VHF, à Rouen (76), 28 mars 2019

22<sup>ème</sup> Édition des Journées de l'École Doctorale NBISE, à Caen (14), 21-22 mars 2019

B. Colleville, N. Perzo, G. Avinée, F. Ziegler, A. Dumesnil, P. Billoir, H. Eltchaninoff, V. Richard et E. Durand. *Effect of vitamin D<sub>3</sub> supplementation and high fat diet in the Egfr<sup>Wa2/Wa2</sup> mouse model*.

22<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique (SFPT), à Toulouse (31), 12-14 juin 2018

2<sup>ème</sup> Journée FHU REMOD-VHF, à Rouen (76), 17 mai 2018

13<sup>ème</sup> Édition du Printemps de la Cardiologie (SFC), à Montpellier (34), 4-6 avril 2018

2<sup>ème</sup> Journée Normande de la Recherche Biomédicale (JNRB), à Caen (14), 14 novembre 2017

N. Perzo, B. Colleville, S. Fraineau, F. Doguet, H. Eltchaninoff, V. Richard et E. Durand. *Isolation et caractérisation des cellules endothéliales et interstitielles de valves humaines aortiques*.

2<sup>ème</sup> Journée Normande de la Recherche Biomédicale (JNRB), à Caen (14), 14 novembre 2017



## Références bibliographiques

1. Menon V, Lincoln J. The Genetic Regulation of Aortic Valve Development and Calcific Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2018;5. doi:10.3389/fcvm.2018.00162
2. Hanneman K, Chan FP, Mitchell RS, Miller DC, Fleischmann D. Pre- and Postoperative Imaging of the Aortic Root. *RadioGraphics*. 2016;36(1):19-37. doi:10.1148/rg.2016150053
3. Anderson RH. Anatomy: Clinical Anatomy of the Aortic Root. *Heart*. 2000;84(6):670-673. doi:10.1136/heart.84.6.670
4. Loukas M, Bilinsky E, Bilinsky S, Blaak C, Tubbs RS, Anderson RH. The Anatomy of the Aortic Root: The Anatomy of the Aortic Root. *Clin Anat*. 2014;27(5):748-756. doi:10.1002/ca.22295
5. Higashidate M, Tamiya K, Beppu T, Imai Y. Regulation of the Aortic Valve Opening. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995;110(2):496-503. doi:10.1016/S0022-5223(95)70246-6
6. Bäck M, Gasser TC, Michel J-B, Caligiuri G. Biomechanical Factors in the Biology of Aortic Wall and Aortic Valve Diseases. *Cardiovasc Res*. 2013;99(2):232-241. doi:10.1093/cvr/cvt040
7. Gould ST, Srigunapalan S, Simmons CA, Anseth KS. Hemodynamic and Cellular Response Feedback in Calcific Aortic Valve Disease. *Circ Res*. 2013;113(2):186-197. doi:10.1161/circresaha.112.300154
8. Sacks MS, David Merryman W, Schmidt DE. On the Biomechanics of Heart Valve Function. *J Biomech*. 2009;42(12):1804-1824. doi:10.1016/j.jbiomech.2009.05.015
9. Armstrong EJ, Bischoff J. Heart Valve Development: Endothelial Cell Signaling and Differentiation. *Circ Res*. 2004;95(5):459-470. doi:10.1161/01.res.0000141146.95728
10. Butcher JT, Markwald RR. Valvulogenesis: the Moving Target. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2007;362(1484):1489-1503. doi:10.1098/rstb.2007.2130
11. Luna-Zurita L, Prados B, Grego-Bessa J, Luxán G, del Monte G, Benguría A, Adams RH, Pérez-Pomares JM, de la Pompa JL. Integration of a Notch-dependent Mesenchymal Gene Program and Bmp2-Driven Cell Invasiveness Regulates Murine Cardiac Valve Formation. *J Clin Invest*. 2010;120(10):3493-3507. doi:10.1172/JCI42666
12. Hinton RB, Yutzey KE. Heart Valve Structure and Function in Development and Disease. *Annu Rev Physiol*. 2011;73(1):29-46. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142145
13. Wu B, Wang Y, Xiao F, Butcher JT, Yutzey KE, Zhou B. Developmental Mechanisms of Aortic Valve Malformation and Disease. *Annu Rev Physiol*. 2017;79(1):21-41. doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034001

14. Wirrig EE, Yutzey KE. Conserved Transcriptional Regulatory Mechanisms in Aortic Valve Development and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(4):737-741. doi:10.1161/atvbaha.113.302071
15. Xu S, Grande-Allen KJ. The Role Of Cell Biology And Leaflet Remodeling In The Progression Of Heart Valve Disease. *Methodist DeBakey Cardiovasc J.* 2010;6(1):2-7. doi:10.14797/mdcj-6-1-2
16. Rutkovskiy A, Malashicheva A, Sullivan G, Bogdanova M, Kostareva A, Stenslkken K, Fiane A, Vaage J. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(9). doi:10.1161/jaha.117.006339
17. Aikawa E, Schoen FJ. Calcific and Degenerative Heart Valve Disease. In: *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease.* Elsevier; 2014:161-180. doi:10.1016/B978-0-12-405206-2.00009-0
18. Butcher JT, Tressel S, Johnson T, Turner D, Sorescu G, Jo H, Nerem RM. Transcriptional Profiles of Valvular and Vascular Endothelial Cells Reveal Phenotypic Differences: Influence of Shear Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(1):69-77. doi:10.1161/01.atv.0000196624.70507.0d
19. Balachandran K, Sucusky P, Yoganathan AP. Hemodynamics and Mechanobiology of Aortic Valve Inflammation and Calcification. *Int J Inflamm.* 2011;2011:1-15. doi:10.4061/2011/263870
20. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic Valve Disease and Treatment: The Need for Naturally Engineered Solutions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(4-5):242-268. doi:10.1016/j.addr.2011.01.008
21. Schoen FJ. Mechanisms of Function and Disease of Natural and Replacement Heart Valves. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2012;7(1):161-183. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130257
22. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP, Otto CM. Calcific Aortic Valve Disease: Not Simply a Degenerative Process: A Review and Agenda for Research From the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group \* Executive Summary: Calcific Aortic Valve Disease-2011 Update. *Circulation.* 2011;124(16):1783-1791. doi:10.1161/circulationaha.110.006767
23. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The Emerging Role of Valve Interstitial Cell Phenotypes in Regulating Heart Valve Pathobiology. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1407-1418. doi:10.2353/ajpath.2007.070251
24. Chen J-H, Yip CYY, Sone ED, Simmons CA. Identification and Characterization of Aortic Valve Mesenchymal Progenitor Cells with Robust Osteogenic Calcification Potential. *Am J Pathol.* 2009;174(3):1109-1119. doi:10.2353/ajpath.2009.080750

25. Bischoff J, Aikawa E. Progenitor Cells Confer Plasticity to Cardiac Valve Endothelium. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011;4(6):710-719. doi:10.1007/s12265-011-9312-0
26. Hajdu Z, Romeo SJ, Fleming PA, Markwald RR, Visconti RP, Drake CJ. Recruitment of Bone Marrow-Derived Valve Interstitial Cells is a Normal Homeostatic Process. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51(6):955-965. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.08.006
27. Ngo DT, Sverdlov AL, Horowitz JD. Prevention of Aortic Valve Stenosis: A Realistic Therapeutic Target? *Pharmacol Ther.* 2012;135(1):78-93. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.04.001
28. Yip CYY, Chen J-H, Zhao R, Simmons CA. Calcification by Valve Interstitial Cells Is Regulated by the Stiffness of the Extracellular Matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(6):936-942. doi:10.1161/atvbaha.108.182394
29. Monzack EL. Can Valvular Interstitial Cells Become True Osteoblasts?: A Side-by-Side Comparison. *J Heart Valve Dis.* 2011;20(4):449-463.
30. Iung B, Vahanian A. Epidemiology of Acquired Valvular Heart Disease. *Can J Cardiol.* 2014;30(9):962-970. doi:10.1016/j.cjca.2014.03.022
31. Varennes O, Six I, Mentaverri R, Kamel S. Mécanismes Physiopathologiques du Rétrécissement Aortique Calcifié. *Rev Francoph Lab.* 2017;2017(493):25-32. doi:10.1016/S1773-035X(17)30236-8
32. Coffey S, Cox B, Williams MJA. The Prevalence, Incidence, Progression, and Risks of Aortic Valve Sclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(25):2852-2861. doi:10.1016/j.jacc.2014.04.018
33. Lindman BR, Clavel M-A, Mathieu P, Iung B, Lancellotti P, Otto CM, Pibarot P. Calcific Aortic Stenosis. *Nat Rev Dis Primer.* 2016;2(1):16006. doi:10.1038/nrdp.2016.6
34. Eveborn GW, Schirmer H, Lunde P, Heggelund G, Hansen J-B, Rasmussen K. Assessment of Risk Factors for Developing Incident Aortic Stenosis: the Tromsø Study. *Eur J Epidemiol.* 2014;29(8):567-575. doi:10.1007/s10654-014-9936-x
35. Acar J, Sarkis A. Rétrécissement Aortique Orificiel de l'Adulte. *Encycl Méd Chir.* 11.011-B-10, 2002, 19
36. Siu SC, Silversides CK. Bicuspid Aortic Valve Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(25):2789-2800. doi:10.1016/j.jacc.2009.12.068
37. Veinot JP. Pathology of Inflammatory Native Valvular Heart Disease. *Cardiovasc Pathol.* 2006;15(5):243-251. doi:10.1016/j.carpath.2006.04.007
38. Simard L, Côté N, Dagenais F, Mathieu P, Couture C, Trahan S, Bossé Y, Mohammadi S, Pagé S, Joubert P, Clavel M-A. Sex-Related Discordance Between Aortic Valve Calcification and Hemodynamic Severity of Aortic Stenosis: Is Valvular Fibrosis the Explanation? *Circ Res.* 2017;120(4):681-691. doi:10.1161/circresaha.116.309306

39. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, Otto CM. Clinical Factors Associated With Calcific Aortic Valve Disease. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(3):630-634. doi:10.1016/S0735-1097(96)00563-3
40. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. Mutations in NOTCH1 Cause Aortic Valve Disease. *Nature.* 2005;437(7056):270-274. doi:10.1038/nature03940
41. Mohamed SA, Aherrahrou Z, Liptau H, Erasmi AW, Hagemann C, Wrobel S, Borzym K, Schunkert H, Sievers HH, Erdmann J. Novel Missense Mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in Patients with Bicuspid Aortic Valve. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;345(4):1460-1465. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.046
42. Ortlepp JR. The Vitamin D Receptor Genotype Predisposes to the Development of Calcific Aortic Valve Stenosis. *Heart.* 2001;85(6):635-638. doi:10.1136/heart.85.6.635
43. Nordstrom P, Glader CA, Dahlen G, Birgander LS, Lorentzon R, Waldenstrom A, Lorentzon M. Oestrogen Receptor Alpha Gene Polymorphism is Related to Aortic Valve Sclerosis in Postmenopausal Women. *J Intern Med.* 2003;254(2):140-146. doi:10.1046/j.1365-2796.2003.01179.x
44. Avakian S, Annicchino-Bizzacchi J, Grinberg M, Ramires J, Mansur A. Apolipoproteins AI, B, and E Polymorphisms in Severe Aortic Valve Stenosis: Apo AI, B, and E polymorphisms in severe AS. *Clin Genet.* 2002;60(5):381-384. doi:10.1034/j.1399-0004.2001.600511.x
45. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, Griffin BP, Iung B, Otto CM, Pellikka PA, Quiñones M. Echocardiographic Assessment of Valve Stenosis: EAE/ASE Recommendations for Clinical Practice. *J Am Soc Echocardiogr.* 2009;22(1):1-23. doi:10.1016/j.echo.2008.11.029
46. Lévy F, Szymanski C, Mahjoub H, Tribouilloy C. Quand Opérer une Sténose Aortique Serrée Asymptomatique? *Ann Cardiol Angéiologie.* 2005;54(3):116-121. doi:10.1016/j.ancard.2005.04.006
47. Stout KK, Otto CM. Indications for Aortic Valve Replacement in Aortic Stenosis. *J Intensive Care Med.* 2007;22(1):14-25. doi:10.1177/0885066606295298
48. Falk V, Holm PJ, Iung B, Lancellotti P, Lansac E, Muñoz DR, Rosenhek R. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the Management of Valvular Heart Disease. *Eur Heart J.* 2017;38(36):2739-2791. doi:10.1093/eurheartj/ehx391
49. Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL, Lauer MS, Sprecher DL, Griffin BP. Effect of Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors on the Progression of Calcific Aortic Stenosis. *Circulation.* 2001;104(18):2205-2209. doi:10.1161/hc4301.098249
50. Rosenhek R, Rader F, Loho N, Gabriel H, Heger M, Klaar U, Schemper M, Binder T, Maurer G, Baumgartner H. Statins but Not Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Delay Progression of Aortic Stenosis. *Circulation.* 2004;110(10):1291-1295. doi:10.1161/01.cir.0000140723.15274.53

51. Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL, Barros IM, Azevedo LF, Rocha-Gonçalves F, Rajamannan NM. Rosuvastatin Affecting Aortic Valve Endothelium to Slow the Progression of Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(5):554-561. doi:10.1016/j.jacc.2006.07.072
52. Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, Ni A, Tam J. Effect of Lipid Lowering With Rosuvastatin on Progression of Aortic Stenosis: Results of the Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring Effects of Rosuvastatin (ASTRONOMER) Trial. *Circulation.* 2010;121(2):306-314. doi:10.1161/circulationaha.109.900027
53. Seo J-H, Chun K-J, Lee B-K, Cho B-R, Ryu DR. Statins Have No Role in Preventing the Progression of Aortic Valve Sclerosis. *J Cardiovasc Imaging.* 2018;26(4):229. doi:10.4250/jcvi.2018.26.e27
54. O'Brien KD, Shavelle DM, Caulfield MT, McDonald TO, Olin-Lewis K, Otto CM, Probstfield JL. Association of Angiotensin-Converting Enzyme With Low-Density Lipoprotein in Aortic Valvular Lesions and in Human Plasma. *Circulation.* 2002;106(17):2224-2230. doi:10.1161/01.cir.0000035655.45453.D2
55. Ngo DT, Stafford I, Sverdlov AL, Qi W, Wuttke RD, Zhang Y, Kelly DJ, Weedon H, Smith MD, Kennedy JA, Horowitz JD. Ramipril Retards Development of Aortic Valve Stenosis in a Rabbit Model: Mechanistic Considerations. *Br J Pharmacol.* 2011;162(3):722-732. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01084.x
56. Ardehali R, Leeper NJ, Wilson AM, Heidenreich PA. The Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Statins on the Progression of Aortic Sclerosis and Mortality. *J Heart Valve Dis.* 2012;21(3):337-43
57. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, Fleisher LA, Jneid H, Mack MJ, McLeod CJ, O'Gara PT, Rigolin VH, Sundt TM, Thompson A. 2017 AHA/ACC Focused Update of the 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation.* 2017;135(25). doi:10.1161/cir.0000000000000503
58. Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, Borenstein N, Tron C, Bauer F, Derumeaux G, Anselme F, Laborde F, Leon MB. Percutaneous Transcatheter Implantation of an Aortic Valve Prosthesis for Calcific Aortic Stenosis: First Human Case Description. *Circulation.* 2002;106(24):3006-3008. doi:10.1161/01.cir.0000047200.36165.B8
59. Smith CR, Svensson LG, Makkar RR, Thourani VH, Herrmann HC, Pocock SJ. Transcatheter versus Surgical Aortic-Valve Replacement in High-Risk Patients. *N Engl J Med.* 2011;364(23):2187-98. doi:10.1056/nejmoa1103510
60. Durand E, Borz B, Godin M, Tron C, Litzler P-Y, Bessou J-P, Bejar K, Fraccaro C, Sanchez-Giron C, Dacher J-N, Bauer F, Cribier A, Eltchaninoff H. Transfemoral Aortic Valve Replacement With the Edwards SAPIEN and Edwards SAPIEN XT Prosthesis Using Exclusively Local Anesthesia and Fluoroscopic Guidance. *JACC Cardiovasc Interv.* 2012;5(5):461-467. doi:10.1016/j.jcin.2012.01.018



61. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP, Otto CM. Calcific Aortic Valve Disease: Not Simply a Degenerative Process. *Circulation*. 2011;124(16):1783-1791. doi:10.1161/circulationaha.110.006767
62. Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, Kovanen PT. Aortic Valve Stenosis: an Active Atheroinflammatory Process. *Curr Opin Lipidol*. 2007;18(5):483-491. doi:10.1097/mol.0b013e3282a66099
63. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the Early Lesion of "Degenerative" Valvular Aortic Stenosis. Histological and Immunohistochemical Studies. *Circulation*. 1994;90(2):844-853. doi:10.1161/01.cir.90.2.844.
64. Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone Formation and Inflammation in Cardiac Valves. *Circulation*. 2001;103(11):1522-1528. doi:10.1161/01.cir.103.11.1522
65. Otto CM. Why is There Discordance Between Calcific Aortic Stenosis and Coronary Artery Disease? *Heart*. 2001;85(6):601-602. doi:10.1136/heart.85.6.601
66. Freeman RV, Otto CM. Spectrum of Calcific Aortic Valve Disease: Pathogenesis, Disease Progression, and Treatment Strategies. *Circulation*. 2005;111(24):3316-3326. doi:10.1161/circulationaha.104.486738
67. Franck G, Even G, Gautier A, Salinas M, Loste A, Procopio E, Gaston A-T, Morvan M, Dupont S, Deschildre C, Berissi S, Laschet J, Nataf P, Nicoletti A, Michel J-B, Caligiuri G. Haemodynamic Stress-Induced Breaches of the Arterial Intima Trigger Inflammation and Drive Atherogenesis. *Eur Heart J*. 2019;40(11):928-937. doi:10.1093/eurheartj/ehy822
68. Morvan M, Arangalage D, Franck G, Perez F, Cattan-Levy L, Codogno I, Jacob-Lenet M-P, Deschildre C, Choqueux C, Even G, Michel J-B, Bäck M, Messika-Zeitoun D, Nicoletti A, Caligiuri G, Laschet J. Relationship of Iron Deposition to Calcium Deposition in Human Aortic Valve Leaflets. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(9):1043-1054. doi:10.1016/j.jacc.2018.12.042
69. Cote C, Pibarot P, Despres J-P, Mohty D, Cartier A, Arsenault BJ, Couture C, Mathieu P. Association Between Circulating Oxidised Low-Density Lipoprotein and Fibrocalcific Remodelling of the Aortic Valve in Aortic Stenosis. *Heart*. 2008;94(9):1175-1180. doi:10.1136/hrt.2007.125740
70. Dweck MR, Boon NA, Newby DE. Calcific Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(19):1854-1863. doi:10.1016/j.jacc.2012.02.093
71. Hulin A, Hego A, Lancellotti P, Oury C. Advances in Pathophysiology of Calcific Aortic Valve Disease Propose Novel Molecular Therapeutic Targets. *Front Cardiovasc Med*. 2018;5:21. doi:10.3389/fcvm.2018.00021

72. Hulthe J, Fagerberg B. Circulating Oxidized LDL Is Associated With Subclinical Atherosclerosis Development and Inflammatory Cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(7):1162-1167. doi:10.1161/01.atv.0000021150.63480.CD
73. Mahmut A, Boulanger M-C, El Hussein D, Fournier D, Bouchareb R, Després J-P, Pibarot P, Bossé Y, Mathieu P. Elevated Expression of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 in Calcific Aortic Valve Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(5):460-469. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.105
74. Capoulade R, Mahmut A, Tastet L, Arsenault M, Bédard É, Dumesnil JG, Després J-P, Larose É, Arsenault BJ, Bossé Y, Mathieu P, Pibarot P. Impact of Plasma Lp-PLA2 Activity on the Progression of Aortic Stenosis. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2015;8(1):26-33. doi:10.1016/j.jcmg.2014.09.016
75. Nsaibia MJ, Boulanger M-C, Bouchareb R, Mkannez G, Le Quang K, Hadji F, Argaud D, Dahou A, Bossé Y, Koschinsky ML, Pibarot P, Arsenault BJ, Murette A, Mathieu P. OxLDL-Derived Lysophosphatidic Acid Promotes the Progression of Aortic Valve Stenosis Through a LPAR1-RhoA-NF-κB Pathway. *Cardiovasc Res.* 2017;113(11):1351-1363. doi:10.1093/cvr/cvx089
76. Yu B, Hafiane A, Thanassoulis G, Ott L, Filwood N, Cerruti M, Gourgas O, Shum-Tim D, Al Kindi H, de Varennes B, Alsheikh-Ali A, Genest J, Schwertani A. Lipoprotein(a) Induces Human Aortic Valve Interstitial Cell Calcification. *JACC Basic Transl Sci.* 2017;2(4):358-371. doi:10.1016/j.jacbts.2017.03.015
77. Perrot N, Thériault S, Dina C, Chen HY, Boekholdt SM, Rigade S, Després A-A, Poulin A, Capoulade R, Le Tourneau T, Messika-Zeitoun D, Trottier M, Tessier M, Guimond J, Nadeau M, Engert JC, Khaw K-T, Wareham NJ, Dweck MR, Mathieu P, Pibarot P, Schott J-J, Thanassoulis G, Clavel M-A, Bossé Y, Arsenault BJ. Genetic Variation in *LPA*, Calcific Aortic Valve Stenosis in Patients Undergoing Cardiac Surgery, and Familial Risk of Aortic Valve Microcalcification. *JAMA Cardiol.* 2019;4(7):620. doi:10.1001/jamacardio.2019.1581
78. Bouchareb R, Mahmut A, Nsaibia MJ, Boulanger M-C, Dahou A, Lépine J-L, Laflamme M-H, Hadji F, Couture C, Trahan S, Pagé S, Bossé Y, Pibarot P, Scipione CA, Romagnuolo R, Koschinsky ML, Arsenault BJ, Murette A, Mathieu P. Autotaxin Derived From Lipoprotein(a) and Valve Interstitial Cells Promotes Inflammation and Mineralization of the Aortic Valve. *Circulation.* 2015;132(8):677-690. doi:10.1161/circulationaha.115.016757.
79. Nadlonek N, Lee JH, Reece TB, Weyant MJ, Cleveland JC, Meng X, Fullerton DA. Interleukin-1 Beta Induces an Inflammatory Phenotype in Human Aortic Valve Interstitial Cells Through Nuclear Factor Kappa Beta. *Ann Thorac Surg.* 2013;96(1):155-162. doi:10.1016/j.athoracsur.2013.04.013
80. Galeone A, Paparella D, Colucci S, Grano M, Brunetti G. The Role of TNF- $\alpha$  and TNF Superfamily Members in the Pathogenesis of Calcific Aortic Valvular Disease. *Sci World J.* 2013;2013:1-10. doi:10.1155/2013/875363

81. Mohty D, Pibarot P, Després J-P, Côté C, Arsenault B, Cartier A, Cosnay P, Couture C, Mathieu P. Association Between Plasma LDL Particle Size, Valvular Accumulation of Oxidized LDL, and Inflammation in Patients With Aortic Stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(1):187-193. doi:10.1161/atvbaha.107.154989
82. Kaden JJ, Dempfle C-E, Grobholz R, Tran H-T, Kılıç R, Sarıkoç A, Brueckmann M, Vahl C, Hagl S, Haase KK, Borggreffe M. Interleukin-1 beta Promotes Matrix Metalloproteinase Expression and Cell Proliferation in Calcific Aortic Valve Stenosis. *Atherosclerosis.* 2003;170(2):205-211. doi:10.1016/S0021-9150(03)00284-3
83. Kaden JJ, Dempfle C-E, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kılıç R, Sarıkoç A, Piñol R, Hagl S, Lang S, Brueckmann M, Borggreffe M. Inflammatory Regulation of Extracellular Matrix Remodeling in Calcific Aortic Valve Stenosis. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14(2):80-87. doi:10.1016/j.carpath.2005.01.002
84. Isoda K, Matsuki T, Kondo H, Iwakura Y, Ohsuzu F. Deficiency of Interleukin-1 Receptor Antagonist Induces Aortic Valve Disease in BALB/c Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(4):708-715. doi:10.1161/atvbaha.109.201749
85. Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Peña-Silva R, Heistad DD. Dysregulation of Antioxidant Mechanisms Contributes to Increased Oxidative Stress in Calcific Aortic Valvular Stenosis in Humans. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(10):843-850. doi:10.1016/j.jacc.2008.05.043
86. Mazzone A, Epistolato MC, De Caterina R, Storti S, Vittorini S, Sbrana S, Gianetti J, Bevilacqua S, Glauber M, Biagini A, Tanganelli P. Neoangiogenesis, T-Lymphocyte Infiltration, and Heat Shock Protein-60 are Biological Hallmarks of an Immunomediated Inflammatory Process in End-Stage Calcified Aortic Valve Stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(9):1670-1676. doi:10.1016/j.jacc.2003.12.041
87. Syväranta S, Helske S, Laine M, Lappalainen J, Kupari M, Mäyränpää MI, Lindstedt KA, Kovanen PT. Vascular Endothelial Growth Factor–Secreting Mast Cells and Myofibroblasts: A Novel Self-Perpetuating Angiogenic Pathway in Aortic Valve Stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(6):1220-1227. doi:10.1161/atvbaha.109.198267.
88. Syväranta S, Helske S, Lappalainen J, Kupari M, Kovanen PT. Lymphangiogenesis in Aortic Valve Stenosis—Novel Regulatory Roles for Valvular Myofibroblasts and Mast Cells. *Atherosclerosis.* 2012;221(2):366-374. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.034
89. Laguna-Fernandez A, Carracedo M, Jeanson G, Nagy E, Eriksson P, Caligiuri G, Franco-Cereceda A, Bäck M. Iron Alters Valvular Interstitial Cell Function and is Associated With Calcification in Aortic Stenosis. *Eur Heart J.* 2016;37(47):3532-3535. doi:10.1093/eurheartj/ehw122
90. Ankeny RF, Thourani VH, Weiss D, Vega JD, Taylor WR, Nerem RM, Jo H. Preferential Activation of SMAD1/5/8 on the Fibrosa Endothelium in Calcified Human Aortic Valves - Association with Low BMP Antagonists and SMAD6. Cardona P-J, ed. *PLoS ONE.* 2011;6(6):e20969. doi:10.1371/journal.pone.0020969

91. Farrar EJ, Pramil V, Richards JM, Mosher CZ, Butcher JT. Valve Interstitial Cell Tensional Homeostasis Directs Calcification and Extracellular Matrix Remodeling Processes via RhoA Signaling. *Biomaterials*. 2016;105:25-37. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.07.034
92. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T. Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype. *Circulation*. 2003;107(17):2181-2184. doi:10.1161/01.cir.0000070591.21548.69
93. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific Aortic Valve Stenosis: Methods, Models, and Mechanisms. *Circ Res*. 2011;108(11):1392-1412. doi:10.1161/circresaha.110.234138
94. Caira FC, Stock SR, Gleason TG, McGee EC, Huang J, Bonow RO, Spelsberg TC, McCarthy PM, Rahimtoola SH, Rajamannan NM. Human Degenerative Valve Disease Is Associated With Up-Regulation of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 Receptor-Mediated Bone Formation. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(8):1707-1712. doi:10.1016/j.jacc.2006.02.040
95. Gu G, Chen T, Zhou H, Sun K, Li J. Role of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway in the Mechanism of Calcification of Aortic Valve. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2014;34(1):33-36. doi:10.1007/s11596-014-1228-x
96. Albanese I, Yu B, Al-Kindi H, Barratt B, Ott L, Al-Refai M, de Varennes B, Shum-Tim D, Cerruti M, Gourgas O, Rhéaume E, Tardif J-C, Schwertani A. Role of Noncanonical Wnts Signaling Pathway in Human Aortic Valve Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(3):543-552. doi:10.1161/atvbaha.116.308394
97. Mathieu P, Boulanger M-C. Basic Mechanisms of Calcific Aortic Valve Disease. *Can J Cardiol*. 2014;30(9):982-993. doi:10.1016/j.cjca.2014.03.029
98. Acharya A, Hans CP, Koenig SN, Nichols HA, Galindo CL, Garner HR, Merrill WH, Hinton RB, Garg V. Inhibitory Role of Notch1 in Calcific Aortic Valve Disease. Pesce M, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e27743. doi:10.1371/journal.pone.0027743
99. Xie C, Shen Y, Hu W, Chen Z, Li Y. Angiotensin II Promotes an Osteoblast-Like Phenotype in Porcine Aortic Valve Myofibroblasts. *Ageing Clin Exp Res*. 2016;28(2):181-187. doi:10.1007/s40520-015-0408-2
100. Hénaut L, Boudot C, Massy ZA, Lopez-Fernandez I, Dupont S, Mary A, Drüeke TB, Kamel S, Brazier M, Mentaverri R. Calcimimetics Increase CaSR Expression and Reduce Mineralization in Vascular Smooth Muscle Cells: Mechanisms of Action. *Cardiovasc Res*. 2014;101(2):256-265. doi:10.1093/cvr/cvt249
101. Mary A, Hénaut L, Boudot C, Six I, Brazier M, Massy ZA, Drüeke TB, Kamel S, Mentaverri R. Calcitriol Prevents In Vitro Vascular Smooth Muscle Cell Mineralization by Regulating Calcium-Sensing Receptor Expression. *Endocrinology*. 2015;156(6):1965-1974. doi:10.1210/en.2014-1744

102. Issa H, Hénaut L, Abdallah JB, Boudot C, Lenglet G, Avondo C, Ibrik A, Caus T, Brazier M, Mentaverri R, Zibara K, Kamel S. Activation of the Calcium-Sensing Receptor in Human Valvular Interstitial Cells Promotes Calcification. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;129:2-12. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.01.021
103. Peltonen T, Taskinen P, Napankangas J, Leskinen H, Ohtonen P, Soini Y, Juvonen T, Satta J, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Increase in Tissue Endothelin-1 and ETA Receptor Levels in Human Aortic Valve Stenosis. *Eur Heart J.* 2008;30(2):242-249. doi:10.1093/eurheartj/ehn482
104. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a Coronary Vasoconstrictor Produced by Cultured Endothelial Cells. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 1985;248(5):C550-C556. doi:10.1152/ajpcell.1985.248.5.C550
105. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells. *Nature.* 1988;332(6163):411-415. doi:10.1038/332411a0
106. Brunner F, Brás-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular Endothelins: Essential Regulators of Cardiovascular Homeostasis. *Pharmacol Ther.* 2006;111(2):508-531. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.11.001
107. Kawanabe Y, Nauli SM. Endothelin. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(2):195-203. doi:10.1007/s00018-010-0518-0
108. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, Pollock DM, Webb DJ, Maguire JJ. Endothelin. *Pharmacol Rev.* 2016;68(2):357-418. doi:10.1124/pr.115.011833
109. Thorin E, Clozel M. The Cardiovascular Physiology and Pharmacology of Endothelin-1. In: *Advances in Pharmacology.* Vol 60. Elsevier; 2010:1-26. doi:10.1016/B978-0-12-385061-4.00001-5
110. Brunner F, Stessel H, Watzinger N, Löffler B-M, Opie LH. Binding of Endothelin to Plasma Proteins and Tissue Receptors: Effects on Endothelin Determination, Vasoactivity, and Tissue Kinetics. *FEBS Lett.* 1995;373(1):97-101. doi:10.1016/0014-5793(95)01017-9
111. Richard V. L'endothéline : de la Découverte aux Avancées Pharmacothérapeutiques. *Presse Médicale.* 2014;43(7-8):742-755. doi:10.1016/j.lpm.2014.01.015
112. Bellien J, Iacob M, Monteil C, Rémy-Jouet I, Roche C, Duflot T, Vendeville C, Gutierrez L, Thuillez C, Richard V, Joannidès R. Physiological Role of Endothelin-1 in Flow-Mediated Vasodilatation in Humans and Impact of Cardiovascular Risk Factors: *J Hypertens.* 2017;35(6):1204-1212. doi:10.1097/hjh.0000000000001307
113. Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, Launois SH, Levy P, Godin-Ribuot D. Major Role for Hypoxia Inducible Factor-1 and the Endothelin System in Promoting Myocardial Infarction and Hypertension in an Animal Model of Obstructive Sleep Apnea. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(15):1309-1317. doi:10.1016/j.jacc.2008.12.050

114. Wu SY, Zhang BH, Pan CS, Jiang HF, Pang YZ, Tang CS, Qi YF. Endothelin-1 is a Potent Regulator In Vivo in Vascular Calcification and In Vitro in Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells. *Peptides*. 2003;24(8):1149-1156. doi:10.1016/j.peptides.2003.07.008
115. Bergler-Klein J, Klaar U, Heger M, Rosenhek R, Gabriel H, Binder T, Pacher R, Maurer G, Baumgartner H. Big Endothelin-1 is Not a Predictor in Aortic Stenosis, But is Related to Arterial Blood Pressure. *Int J Cardiol*. 2006;113(2):174-180. doi:10.1016/j.ijcard.2005.11.008
116. Leskelä H-V, Vuolteenaho O, Koivula M-K, Taskinen P, Peltonen T, Lehenkari P. Tezosentan Inhibits Uptake of Proinflammatory Endothelin-1 in Stenotic Aortic Valves. *J Heart Valve Dis*. 2012;21(1):9
117. Guerraty MA, Grant GR, Karanian JW, Chiesa OA, Pritchard WF, Davies PF. Hypercholesterolemia Induces Side-Specific Phenotypic Changes and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Pathway Activation in Swine Aortic Valve Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(2):225-231. doi:10.1161/atvbaha.109.198549.
118. Gerrity RG, Natarajan R, Nadler JL, Kimsey T. Diabetes-Induced Accelerated Atherosclerosis in Swine. *Diabetes*. 2001;50(7):1654-1665. doi:10.2337/diabetes.50.7.1654
119. Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, Davies PF. Spatial Heterogeneity of Endothelial Phenotypes Correlates With Side-Specific Vulnerability to Calcification in Normal Porcine Aortic Valves. *Circ Res*. 2005;96(7):792-799. doi:10.1161/01.res.0000161998.92009.64
120. Sarphie T. Surface Responses of Aortic Valve Endothelia from Diet-Induced, Hypercholesterolemic Rabbits. *Atherosclerosis*. 1985;54(3):283-299. doi:10.1016/0021-9150(85)90122-4
121. Rajamannan NM, Subramaniam M, Springett M, Sebo TC, Niekrasz M, McConnell JP, Singh RJ, Stone NJ, Bonow RO, Spelsberg TC. Atorvastatin Inhibits Hypercholesterolemia-Induced Cellular Proliferation and Bone Matrix Production in the Rabbit Aortic Valve. *Circulation*. 2002;105(22):2660-2665. doi:10.1161/01.cir.0000017435.87463.72
122. Waters EA, Chen J, Allen JS, Zhang H, Lanza GM, Wickline SA. Detection and Quantification of Angiogenesis in Experimental Valve Disease with Integrin-Targeted Nanoparticles and 19-Fluorine MRI/MRS. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2008;10(1):43. doi:10.1186/1532-429X-10-43
123. Drolet M-C, Arsenault M, Couet J. Experimental Aortic Valve Stenosis in Rabbits. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(7):1211-1217. doi:10.1016/S0735-1097(03)00090-1
124. Hekimian G, Passefort S, Louedec L, Houard X, Jacob MP, Vahanian A, Michel JB, Messika-Zeitoun D. High-Cholesterol + Vitamin D2 Regimen: A Questionable In-Vivo Experimental Model of Aortic Valve Stenosis. *J Heart Valve Dis*. 2009;18(2):8

125. Mjaatvedt CH, Kern CB, Norris RA, Fairey S, Cave CL. Normal Distribution of Melanocytes in the Mouse Heart. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2005;285A(2):748-757. doi:10.1002/ar.a.20210
126. Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, Young SG, Heistad DD. Calcific Aortic Valve Stenosis in Old Hypercholesterolemic Mice. *Circulation.* 2006;114(19):2065-2069. doi:10.1161/circulationaha.106.634139
127. Matsumoto Y, Adams V, Jacob S, Mangner N, Schuler G, Linke A. Regular Exercise Training Prevents Aortic Valve Disease in Low-Density Lipoprotein–Receptor–Deficient Mice. *Circulation.* 2010;121(6):759-767. doi:10.1161/circulationaha.109.892224
128. Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, Brooks RM, Berry CJ, Zimmerman K, Young SG, Heistad DD. Lowering Plasma Cholesterol Levels Halts Progression of Aortic Valve Disease in Mice. *Circulation.* 2009;119(20):2693-2701. doi:10.1161/circulationaha.108.834614
129. Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, Castaneda LE, Brooks RM, Zimmerman K, Heistad DD. Evidence for Active Regulation of Pro-Osteogenic Signaling in Advanced Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2482-2486. doi:10.1161/atvbaha.110.211029
130. Tanaka K, Sata M, Fukuda D, Suematsu Y, Motomura N, Takamoto S, Hirata Y, Nagai R. Age-Associated Aortic Stenosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(1):134-141. doi:10.1016/j.jacc.2005.03.058
131. Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D, Lok VM, Jaffer FA, Aikawa M, Weissleder R. Multimodality Molecular Imaging Identifies Proteolytic and Osteogenic Activities in Early Aortic Valve Disease. *Circulation.* 2007;115(3):377-386. doi:10.1161/circulationaha.106.654913
132. Drolet M-C, Roussel E, Deshaies Y, Couet J, Arsenault M. A High Fat/High Carbohydrate Diet Induces Aortic Valve Disease in C57BL/6J Mice. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(4):850-855. doi:10.1016/j.jacc.2005.09.049
133. Lee TC, Zhao YD, Courtman DW, Stewart DJ. Abnormal Aortic Valve Development in Mice Lacking Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation.* 2000;101(20):2345-2348. doi:10.1161/01.cir.101.20.2345
134. El Accaoui RN, Gould ST, Hajj GP, Chu Y, Davis MK, Kraft DC, Lund DD, Brooks RM, Doshi H, Zimmerman KA, Kutschke W, Anseth KS, Heistad DD, Weiss RM. Aortic Valve Sclerosis in Mice Deficient in Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2014;306(9):H1302-H1313. doi:10.1152/ajpheart.00392.2013
135. Nigam V, Srivastava D. Notch1 Represses Osteogenic Pathways in Aortic Valve Cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(6):828-834. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.08.008

136. Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, Narumi T, Kadowaki S, Honda Y, Otaki Y, Hasegawa H, Netsu S, Funayama A. A Novel Mouse Model of Aortic Valve Stenosis Induced by Direct Wire Injury Significance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(2):270–278. doi:10.1161/atvbaha.113.302610
137. Chen B, Bronson RT, Klamann LD, Hampton TG, Wang J, Green PJ, Magnuson T, Douglas PS, Morgan JP, Neel BG. Mice Mutant for Egfr and Shp2 Have Defective Cardiac Semilunar Valvulogenesis. *Nat Genet.* 2000;24(3):296-299. doi:10.1038/73528
138. Luetkeke NC, Phillips HK, Qiu TH, Copeland NG, Earp HS, Jenkins NA, Lee DC. The Mouse Waved-2 Phenotype Results From a Point Mutation in the EGF Receptor Tyrosine Kinase. *Genes Dev.* 1994;8(4):399-413. doi:10.1101/gad.8.4.399
139. Barrick CJ, Roberts RB, Rojas M, Rajamannan NM, Suitt CB, O'Brien KD, Smyth SS, Threadgill DW. Reduced EGFR Causes Abnormal Valvular Differentiation Leading to Calcific Aortic Stenosis and Left Ventricular Hypertrophy in C57BL/6J But Not 129S1/SvImJ Mice. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2009;297(1):H65-H75. doi:10.1152/ajpheart.00866.2008
140. Hajj GP, Chu Y, Lund DD, Magida JA, Funk ND, Brooks RM, Baumbach GL, Zimmerman KA, Davis MK, El Accaoui RN, Hameed T, Doshi H, Chen B, Leinwand LA, Song L-S, Heistad DD, Weiss RM. Spontaneous Aortic Regurgitation and Valvular Cardiomyopathy in Mice Significance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(7):1653-1662. doi:10.1161/atvbaha.115.305729.
141. Skeidsvoll J, Magne Ueland P. Analysis of Double-Stranded DNA by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection Using the Monomeric Dye SYBR Green I. *Anal Biochem.* 1995;231(2):359-365. doi:10.1006/abio.1995.9986
142. Gould RA, Butcher JT. Isolation of Valvular Endothelial Cells. *J Vis Exp.* 2010;(46):2158. doi:10.3791/2158
143. Hjortnaes J, Shapero K, Goettsch C, Hutcheson JD, Keegan J, Kluin J, Mayer JE, Bischoff J, Aikawa E. Valvular Interstitial Cells Suppress Calcification of Valvular Endothelial Cells. *Atherosclerosis.* 2015;242(1):251-260. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.008
144. Porras AM, van Engeland NCA, Marchbanks E, McCormack A, Bouten CVC, Yacoub MH, Latif N, Masters KS. Robust Generation of Quiescent Porcine Valvular Interstitial Cell Cultures. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(3). doi:10.1161/jaha.116.005041
145. Larivière R, Gauthier-Bastien A, Ung R-V, St-Hilaire J, Mac-Way F, Richard DE, Agharazii M. Endothelin Type A Receptor Blockade Reduces Vascular Calcification and Inflammation in Rats With Chronic Kidney Disease: *J Hypertens.* 2017;35(2):376-384. doi:10.1097/hjh.0000000000001161
146. Qing P, Li X-L, Zhang Y, Li Y-L, Xu R-X, Guo Y-L, Li S, Wu N-Q, Li J-J. Association of Big Endothelin-1 with Coronary Artery Calcification. *PLOS ONE.* 2015;10(11). doi:10.1371/journal.pone.0142458



147. Xu R, Zhao M, Yang Y, Huang Z, Shi C, Hou X, Zhao Y, Chen B, Xiao Z, Liu J, Miao Q, Dai J. MicroRNA-449c-5p Inhibits Osteogenic Differentiation of Human VICs Through Smad4-Mediated Pathway. *Sci Rep.* 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-09390-z



