



**HAL**  
open science

# Rôle des monocytes dans la prise en charge des calcifications vasculaires : implication du récepteur sensible au calcium (CaSR)

Thibaut Objois

## ► To cite this version:

Thibaut Objois. Rôle des monocytes dans la prise en charge des calcifications vasculaires : implication du récepteur sensible au calcium (CaSR). Sciences agricoles. Université de Picardie Jules Verne, 2020. Français. NNT : 2020AMIE0043 . tel-03624633

**HAL Id: tel-03624633**

**<https://theses.hal.science/tel-03624633>**

Submitted on 30 Mar 2022

**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.



# Thèse de Doctorat

*Mention : Sciences et Santé*  
*Spécialité : Physiopathologie Humaine*

présentée à l'*Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

**OBJOIS THIBAUT**

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Rôle des monocytes dans la prise en charge des  
calcifications vasculaires : implication du récepteur sensible  
au calcium (CaSR)*

Soutenue le Lundi 14 Décembre 2020 après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

**M. PACCOU Julien, PU-PH**

**Mme ESSIG Marie, PU-PH**

**M. BLAISE Sébastien, MCU**

**M. BRAZIER Michel, PU-PH**

**Mme SIX Isabelle, MCU**

**M. MENTAVERRI Romuald, PU-PH**

**Président**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examineur**

**Directrice de Thèse**

**Directeur de Thèse**

## **Remerciements**

En tout premier lieu, je tiens à remercier le Professeur Saïd Kamel, directeur de l'unité MP3CV, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire depuis mon arrivée en 2015. J'ai apprécié travailler avec vous, votre rigueur, votre sens critique et vos conseils ont été de vrais atouts pour mon travail.

Je tiens à remercier très chaleureusement mes directeurs de thèse, le Docteur Isabelle Six et le Professeur Romuald Mentaverri. Vous m'avez accompagné depuis le Master 2 il y a 5 ans déjà, vous m'avez donné l'opportunité de m'initier à la recherche et m'avez confié ce projet de thèse par la suite. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir guidé lors de mes travaux et pour toute l'aide que vous m'avez apporté tout au long de ma thèse. Je n'oublierais jamais les multiples réunions que nous avons eues (environ 1500 si mes comptes sont exacts), les congrès et autres bons moments passés ensemble. Depuis le début vous avez cru en moi, sans vous je n'aurais pas pu réaliser ce travail, merci.

Je remercie le Professeur Michel Brazier pour son aide, ses conseils avisés et son implication aux réunions autour de mon sujet de thèse. Je vous suis également reconnaissant d'être examinateur de mon travail.

Un grand merci au Docteur Aurélien Mary, qui m'a apporté son aide et son savoir au cours de ma thèse. Ta contribution à ce travail a permis d'en améliorer sa qualité scientifique. Je t'en suis très reconnaissant.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres de mon jury de thèse. Je remercie très sincèrement le Professeur Marie Essig et le Professeur Julien Paccou d'avoir acceptés d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également le Docteur Sébastien Blaise d'être examinateur de mon manuscrit. Je vous suis très reconnaissant.

*A mes collègues et amis,*

Comment ne pas remercier le Docteur Cédric Boudot qui m'a tout appris, de la culture cellulaire en passant par le Western Blot ou la cytométrie en flux. Autant de techniques qui m'ont permis de réaliser ce travail de thèse. Merci de m'avoir transmis ton savoir technique, de m'avoir aidé

et conseillé durant ces 5 années passées ensemble. Toujours de bonne humeur, je n'oublierais pas tous les moments passés ensemble, à rigoler, à boire des cafés ou à choisir notre repas du midi.

Lucie, ta passion pour la recherche ne mérite que ma profonde admiration. Nos échanges, ton aide et tes conseils m'ont beaucoup apporté dans mon travail. Les moments passés en dehors du labo (L.A. 2017 baby !) resteront toujours dans ma mémoire. Merci pour ces quelques années à travailler ensemble.

Une pensée pour Monsieur le Doyen Jean-Marc Chillon, même si nous n'avons pas travaillé ensemble, nous avons passés d'excellents moments, avec ou sans champagne. Je retiendrais surtout une attraction à Los Angeles où les barrières de sécurité du wagon ne nous ont pas été d'une grande utilité.

J'aimerais aussi remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire MP3CV pour leurs conseils et leur soutien : Carine, Chantal, Elodie, Gaëlle, Loïc, Marlène, Michaël, Nissrine, Sabrina, Youssef, Walaa et tous ceux que je n'ai pas cités. Merci d'avoir contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Un grand merci à Julie de la plateforme animale et Luciane de la plateforme imagerie pour leur aide.

Je souhaite également tous mes vœux de réussite aux doctorants avec qui j'ai pu travailler : Ali, Camille, Linda, Maria, Nadia et Souvik. Courage à vous et bonne chance pour la suite.

Un merci tout particulier à Céline, qui m'a fait découvrir son quotidien de chirurgienne, j'ai apprécié travailler en ta compagnie, tu as accomplis déjà beaucoup de choses mais je te souhaite le meilleur pour la suite et j'espère qu'on pourra partager d'autres moments ensemble.

Je tenais à remercier Alexandre et Yuthiline, avec qui j'ai passé d'excellents moments et de nombreuses rigolades dans notre bureau mais aussi en dehors. Vous avez été plus que des collègues, j'espère qu'on sera amené à se recroiser.

Je remercie tous les collègues ou anciens collègues avec qui j'ai passé de très bons moments : Audrey, Benjamin, Emilien, Maryam, Mathilde, Ophélie... Je vous souhaite bon courage pour la suite.

*A ma famille et mes amis,*

Un énorme merci à mes parents, pour leur soutien de tous les jours, leur amour, cette réussite professionnelle est pour eux une grande fierté, je leur en serai éternellement reconnaissant.

A ma famille, mes grands-parents, qui je pense auraient été fiers de ce jour. A Clément, le couz, toujours présent depuis le début, trop de souvenirs pour n'en citer qu'un, j'espère qu'on vivra encore pleins de bons moments ensemble et je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je tiens également à remercier ma belle-famille, pour leur soutien et leur présence durant ces années de travail. Je tiens à passer encore de merveilleux moments avec vous.

A tous mes amis, la team, ma troisième famille, vous êtes nombreux et j'espère que vous vous reconnaîtrez dans ces quelques mots. Merci pour votre soutien et toutes les soirées, anniversaires, naissances et autres moments partagés ensemble. Vous êtes précieux et vous comptez beaucoup pour moi. Je me souviendrais de cette phrase que j'ai dû vous entendre prononcer au moins une centaine de fois : « C'est quand ta thèse ? ».

Olivier, éternel collègue, tu es maintenant bien plus que ça, tu es devenu un ami. Je ne pourrais pas citer tous les fous rires, les bières, les cafés et les excellents moments passés ensemble. J'ai adoré travailler avec toi, ton aide et ton soutien m'ont été précieux.

Enfin, je remercie particulièrement celle sans qui je ne serais certainement pas là aujourd'hui. Céline, mon cœur, merci pour ton amour tout au long de ces années. Tu as partagé avec moi les bons comme les mauvais moments. Tu as toujours été à mes côtés à me soutenir et à m'encourager. Nous avons encore tellement de choses à vivre ensemble. Pour tout ça je n'ai qu'une chose à dire, je t'aime.

## **Table des matières**

<b>Remerciements.....</b>	<b>2</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>8</b>
<b>Abréviations .....</b>	<b>9</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>10</b>
<b>Synthèse bibliographique .....</b>	<b>13</b>
A - Les calcifications vasculaires .....	14
1 - Définition et épidémiologie .....	14
2 - Facteurs de risques et pathologies associées au développement des calcifications vasculaires	16
3 - Les différentes calcifications vasculaires .....	18
4 - Les mécanismes généraux des calcifications vasculaires .....	22
B - Les monocytes .....	29
1 - Origine cellulaire.....	29
2 - Les différentes populations de monocytes .....	32
3 - Rôle des monocytes .....	36
C - Le récepteur sensible au calcium : CaSR .....	41
1 - Structure du récepteur sensible au calcium .....	41
2 - Les rôles biologiques du CaSR .....	43
3 - Adressage membranaire et signalisation du CaSR.....	45
4 - Les modulateurs du CaSR.....	46
5 - Rôle du CaSR dans les calcifications vasculaires .....	48
6 - CaSR et monocytes .....	50
<b>Objectifs de travail .....</b>	<b>52</b>
<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>54</b>
1 - Cellules, lignées et milieux de culture .....	55
2 - Animaux et prélèvement des segments carotidiens.....	55
3 - Modèle de calcification .....	56
3-1 Modèle Préventif.....	57
3-2 Modèle Curatif.....	58
4 - Mise en évidence des calcifications .....	58

4-1 Dosage de calcium par ortho-crésol-phtaléin.....	58
4-2 Coloration au rouge d'Alizarine.....	59
4-3 Marquage à l'agent fluorescent OsteoSense® 680 EX.....	59
5 - Localisation des monocytes dans les segments carotidiens .....	59
6 - Analyse par cytométrie en flux .....	60
7 - Transwell®.....	61
8 - Surnageants de culture .....	62
9 - Préincubation des cellules au calcimimétique/calcilytique.....	62
10 - Analyse statistique.....	62
<b>Résultats/Article .....</b>	<b>63</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>68</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>75</b>
<b>Publications, présentations orales et affichées .....</b>	<b>77</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>80</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>101</b>

## **Liste des figures**

- Figure 1 : Causes principales de décès dans le monde en 2016. (p.15)
- Figure 2 : Relation entre la présence de calcifications vasculaires et la mortalité cardiovasculaire. (p.16)
- Figure 3 : Schéma représentant les 3 tuniques des vaisseaux sanguins. (p.18)
- Figure 4 : Les différents types de calcifications vasculaires. (p.19)
- Figure 5 : Processus impliqués dans le développement des calcifications vasculaires. (p.23)
- Figure 6 : Mécanismes impliqués dans la différenciation des cellules musculaires lisses en cellules de phénotype ostéo-chondrocytaire sous l'influence de différents agents inducteurs. (p.24)
- Figure 7 : Régulation de l'homéostasie phosphocalcique (p.26)
- Figure 8 : Schéma représentant la maturation médullaire du monocyte. (p.30)
- Figure 9 : Devenir des monocytes selon les organes dans lesquels ils résident. (p.31)
- Figure 10 : Différenciation des monocytes en macrophages ou en ostéoclastes. (p.31)
- Figure 11 : Rôles potentiels des différentes sous-populations monocytaires. (p.36)
- Figure 12 : Représentation du recrutement des monocytes au niveau de l'endothélium. (p.38)
- Figure 13 : Rôle des monocytes dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose. (p.39)
- Figure 14 : Les différentes fonctions physiologiques du CaSR dans l'organisme. (p.41)
- Figure 15 : Représentation schématique du CaSR sous sa forme active. (p.43)
- Figure 16 : Le CaSR et la régulation de l'homéostasie phosphocalcique. (p.44)
- Figure 17 : Les voies de signalisation activées par le CaSR. (p.45)
- Figure 18 : Structure des différents modulateurs allostériques du CaSR. (p.47)
- Figure 19 : Les différents mécanismes d'action possibles des calcimimétiques sur les calcifications cardiovasculaires. (p.50)
- Figure 20 : Résultats d'une étude démontrant la chimioattraction exercée par le calcium sur les monocytes. (p.51)
- Figure 21 : Expression du CaSR par les monocytes de la lignée THP-1. (p.51)
- Figure 22 : Les différentes étapes du prélèvement d'une carotide de rat. (p.56)
- Figure 23 : Schéma des deux modèles d'études : Préventif et Curatif. (p.57)



## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Les cinq stades de la maladie rénale chronique. (p.27)

Tableau 2 : Caractéristiques et fonctions des sous-populations de monocytes humains. (p.33)

Tableau 3 : Les différents modulateurs du CaSR. (p.46)

Tableau 4 : Références, caractéristiques et dilutions des anticorps primaires et secondaires utilisés pour la cytométrie de flux. (p.61)

## Abréviations

**AVC** : Accident Vasculaire Cérébral

**CaSR** : *Calcium Sensing-Receptor* / Récepteur sensible au calcium

**CCR** : *C-C chemokine receptor* / Récepteur des chimiokines CC

**CD14, CD16** : *Cluster of Differentiation 14,16* / Classe de différentiation 14,16

**CFU-GEMM** : *Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte, Megakaryocyte* / Unité de formation des Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte, Megakaryocyte

**CMLV** : Cellule Musculaire Lisse Vasculaire

**CSF** : *Colony Stimulating Factor* / Facteur stimulant des colonies

**CV** : Calcification Vasculaire

**DAG** : Diacylglycérol

**DFG** : Débit de filtration glomérulaire

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène

**FGF-23** : *Fibroblast Growth Factor-23* / Facteur de croissance des fibroblastes 23

**FGF-R** : *Fibroblast Growth Factor-Receptor* / Récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes

**GM-CSF** : *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor* / Facteur de croissance des Granulocyte-Macrophage

**GPCR** : *G protein-coupled receptor* / Récepteurs couplés aux protéines G

**HLA** : *Human Leukocyte Antigen* / Antigène des leucocytes humains

**HPTS** : Hyperparathyroïdie secondaire

**HTA** : Hypertension Artérielle

**ICAM-1** : *InterCellular Adhesion Molecule-1* / Molécule d'adhésion intercellulaire de type 1

**IFN- $\gamma$**  : Interféron gamma

**IP<sub>3</sub>** : Inositol trisphosphate

**IRC** : Insuffisance Rénale Chronique

**LDL** : *Low Density Lipoprotein* / Lipoprotéine de faible densité

**MAPK** : *Mitogen Activated Protein Kinase*

**MCP-1** : *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

**M-CSF** : *Macrophage Colony Stimulating Factor* / Facteur de croissance des macrophages

**MGP** : *Matrix Gla Protein*

**OCN** : Ostéocalcine

**OPN** : Ostéopontine

**PAL** : Phosphatase Alcaline

**PBMC** : *Peripheral Blood Mononuclear Cell* / Cellules mononuclées du sang périphérique

**PKA, PKC** : Protéine kinase A, C

**PLC** : Phospholipase C

**PPi** : Pyrophosphate

**PTH** : Hormone parathyroïdienne

**RANKL** : *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*

**TNF- $\alpha$**  : *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  / Facteur de nécrose tumorale- $\alpha$

**VCAM** : *Vascular Cell Adhesion Molecule* / Molécule d'adhésion des cellules vasculaires

## **Introduction**

Les calcifications vasculaires (CV) sont définies comme une accumulation pathologique de cristaux de calcium et de phosphate dans les vaisseaux sanguins. Fréquentes dans la population générale, leur présence et leur importance sont accrues lorsque les patients présentent certaines pathologies chroniques telles que l'insuffisance rénale chronique (IRC), le diabète ou l'athérosclérose. Les mécanismes à l'origine des CV ne sont pas le résultat d'une précipitation passive avec dépôt de minéral au niveau des vaisseaux, mais font suite à des phénomènes hautement régulés présentant de nombreuses similitudes avec l'ossification physiologique.

Pour rappel, le tissu osseux est composé d'un ensemble d'éléments inorganiques (ions calcium et phosphate) et d'une matrice organique (essentiellement constituée de collagène de type I). Au-delà de son rôle de soutien des organes et dans la locomotion, le squelette joue un rôle fondamental dans l'homéostasie phosphocalcique. Tout au long de la vie, l'os est continuellement soumis à ce qu'on appelle le remodelage osseux. Ce remodelage est un processus consistant en une alternance d'une phase de dégradation osseuse et d'une phase de formation osseuse. Il implique principalement deux cellules : les ostéoblastes, responsables de la formation de la matrice osseuse et de sa minéralisation ; et les ostéoclastes, responsables de la dégradation du tissu osseux et seules ces cellules sont capables de résorber l'os. La minéralisation de la matrice se fait par l'intermédiaire de vésicules matricielles émises par les ostéoblastes qui vont servir de point de nucléation aux ions calcium et phosphate. Ces ions s'associent pour former des cristaux d'hydroxyapatite au sein de la matrice extracellulaire osseuse, conférant à l'os sa résistance à la rupture et à l'étirement. L'intégrité du squelette dépend de l'équilibre entre dégradation et formation osseuse. Cet équilibre est placé sous la régulation de facteurs endocriniens, également connus pour être impliqués dans le développement des CV, tels que l'hormone parathyroïdienne (PTH) ou la vitamine D, pour n'en citer que quelques-uns.

La formation de calcifications ectopiques au niveau des vaisseaux présente des similarités avec l'ossification endochondrale. Ainsi, au travers de l'activation des mécanismes de plasticité des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), ces dernières se différencient en cellules de nature ostéo-chondrocytaire (dites ostéoblast-like cells). Elles acquièrent alors la capacité d'exprimer des protéines spécifiques de l'os et produisent des vésicules matricielles. Cependant,

à la différence de ce qui est observé au sein du tissu osseux, aucune cellule ne semble exercer une activité de nature ostéoclastique au niveau vasculaire.

Comme nous l'avons décrit précédemment, le remodelage osseux résulte d'un équilibre entre formation osseuse via les ostéoblastes et résorption via les ostéoclastes. S'il existe, le remodelage des CV pourrait également faire intervenir des cellules aux capacités ostéoclastiques qui permettraient de prendre en charge les dépôts de minéral présents au sein des vaisseaux. Dans ce contexte physiopathologique, les monocytes pourraient être le chaînon manquant dans le remodelage des CV. Cellules du système immunitaire inné, les monocytes sont doués d'une plasticité cellulaire importante qui leur permet de s'engager phénotypiquement en macrophage en réponse aux conditions environnementales qu'ils rencontrent. Les monocytes jouent un rôle important dans l'initiation et la progression de pathologies vasculaires comme l'athérosclérose et les CV. Par ailleurs, les monocytes sont également capables de se différencier en ostéoclastes sous l'influence de facteurs de transcription et de facteurs de croissance (M-CSF, RANKL). Dans un contexte physiologique, la présence de cellules ayant de telles capacités participerait à minima à limiter le développement des CV. Des conditions pathologiques, propices à leur disparition ou à une diminution de leur activité, favoriseraient quant à elles le développement des CV, limitant par la même occasion notre capacité à les observer et à les étudier chez les patients.

A côté de son rôle central dans la régulation de la calcémie, le récepteur sensible au calcium (CaSR) est impliqué dans de nombreux phénomènes biologiques associés à la physiologie tissulaire et/ou à la pathologie. Des travaux réalisés ces dernières années, entre autres au sein de l'unité MP3CV, ont pu mettre en évidence l'importance de l'expression et de la stimulation du CaSR d'une part dans le contrôle du remodelage osseux et d'autre part dans la survenue et le développement des CV. L'hypothèse formulée par notre équipe serait que l'expression du CaSR, sa stimulation par le calcium et/ou par un calcimimétique - un agent pharmacologique stimulant le CaSR -, protégerait les patients du développement et de la progression des CV. Notre équipe de recherche a notamment démontré que la stimulation du CaSR est associée à un effet direct sur les CMLV, en empêchant leur trans-différenciation en cellules aux propriétés ostéogéniques, inhibant le processus de CV<sup>1</sup>.

L'analyse par cytométrie en flux de l'expression du CaSR au niveau des monocytes isolés du sang périphérique nous a permis de mettre en évidence que plus de 95% des monocytes humains

circulants (CD14+) expriment le CaSR au niveau de leur membrane cellulaire. Ceci ne semble pas être le cas des autres cellules mononuclées (CD14-) isolées du sang total, bien que ces dernières expriment le CaSR au sein de leurs compartiments plasmatiques<sup>2,3</sup>. Nous nous sommes donc posé la question de savoir quelle(s) compétence(s) singulière(s) présentaient les monocytes circulants grâce à cette particularité. Compte tenu de l'ensemble de ces données et de l'effet chimioattractant exercé par la stimulation du CaSR par le calcium sur les monocytes circulants<sup>4</sup>, nous nous sommes orientés vers l'étude du rôle exercé par la stimulation du CaSR sur la fonction de sentinelle qui pourrait être jouée par certains monocytes circulants dans un contexte de calcification vasculaire.

Dans ce contexte, nous avons étudié le rôle des monocytes dans le développement ou la résorption des CV *in vitro* et le rôle du CaSR dans ces phénomènes. Afin de répondre à cet objectif, nous avons développé un modèle de calcification à partir de segments carotidiens. Ces segments ont été exposés à des concentrations élevées de phosphate inorganique pour initier le processus de minéralisation. Des lignées cellulaires monocytaires humaines (U937 ou THP-1) ou des PBMC ont été ajoutées aux segments carotidiens. Le calcilytique NPS-2143 et le calcimimétique R-568 ont été utilisés comme outils pharmacologiques permettant de stimuler le CaSR des monocytes et d'étudier son rôle dans la prise en charge des CV. L'utilisation d'agents fluorescents en microscopie confocale a permis de démontrer la capacité des monocytes à internaliser des fragments de calcifications lorsque celles-ci sont présentes au niveau vasculaire.

## **Synthèse bibliographique**

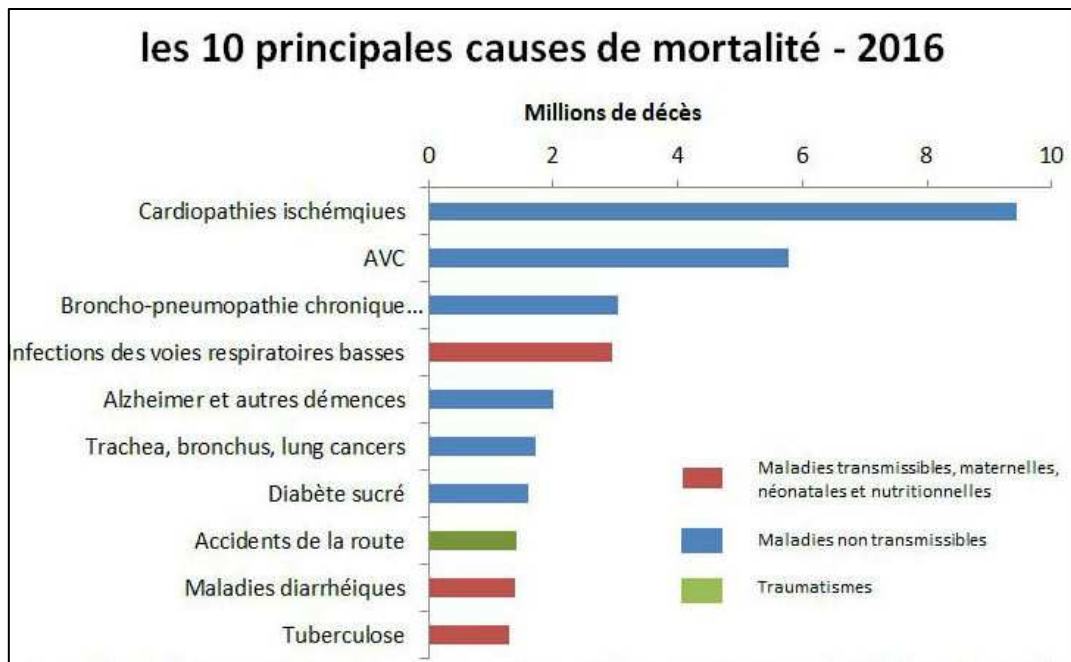
## A - Les calcifications vasculaires

La calcification est un processus physico-chimique physiologique ou pathologique associé à l'accumulation de cristaux contenant du calcium au sein d'une structure biologique. Lorsqu'elles se développent au sein du système cardiovasculaire, ces calcifications sont appelées CV. Elles sont classées en quatre grandes catégories qui peuvent être observées chez les patients de façon isolée ou concomitante. Longtemps considérées comme le résultat d'un processus passif et purement physico-chimique, nous savons maintenant que leur initiation et leur développement résultent d'un processus actif semblable à celui s'opérant lors de la minéralisation osseuse et impliquant de nombreux types cellulaires dont les CMLV<sup>5</sup>, les cellules endothéliales et les monocytes circulants.

Les CV se développent aussi bien au niveau de l'intima du vaisseau, dans le cadre de l'évolution de la plaque d'athérosclérose, qu'au sein de la média, dans un contexte d'IRC par exemple. Elles sont observées dans la population générale car elles font partie du processus de vieillissement que subit l'organisme. Cependant, leur développement est accéléré dans le cadre de pathologies telles que l'athérosclérose, le diabète, les pathologies inflammatoires, et la maladie rénale chronique (MRC). L'étendue et la sévérité des calcifications sont reconnues comme des facteurs de risque majeurs, prédictifs d'une morbidité et d'une mortalité suite à l'augmentation de la survenue d'événements cardiovasculaires chez les patients.

### 1 - Définition et épidémiologie

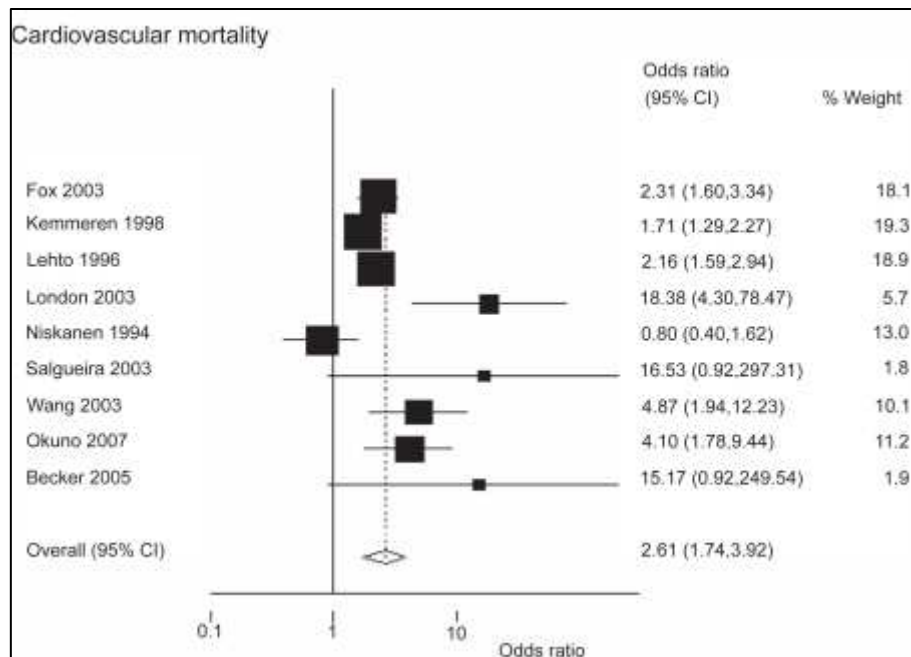
Les pathologies cardiovasculaires représentent la première cause de morbi-mortalité selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Par an, il a été estimé que 17,7 millions de décès étaient imputables aux maladies cardiovasculaires, soit 31% de la mortalité mondiale totale. Parmi ces décès, on estime que 9,3 millions sont dus à une cardiopathie et 5,9 millions à un accident vasculaire cérébral (AVC) (chiffres 2016) (**Figure 1**).



**Figure 1 : Causes principales de décès dans le monde en 2016 (Source : OMS<sup>6</sup>).**

Cliniquement, la présence de CV se traduit par un risque accru d'événements cardiovasculaires. Une méta-analyse concernant un total de 17187 participants et rassemblant les données recueillies par 9 études cliniques a évalué le risque de mortalité cardiovasculaire lorsqu'une CV est détectée. Parmi ces patients, 3657 présentaient des CV. Au sein de cette sous-population de patients, 718 décès de causes cardiovasculaires ont été rapportés<sup>7</sup> (**Figure 2**). Plus généralement, la majorité des personnes âgées de plus de 60 ans présentent des dépôts de minéralisation phosphocalciques au niveau artériel<sup>8</sup>. Ces dépôts altèrent l'hémodynamique cardiovasculaire et participent à l'apparition d'une hypertension, d'une sténose aortique, d'une hypertrophie cardiaque, d'une ischémie, d'une insuffisance cardiaque et compromettent l'intégrité structurale des vaisseaux<sup>9</sup>. *Budoff et al.* a d'ailleurs démontré sur une cohorte de 25 253 patients que l'augmentation du score de calcifications était associée à une diminution de 6,8 ans de survie<sup>10</sup>. Ainsi, l'étendue et la sévérité de la CV sont reconnues comme des facteurs de risques majeurs, prédictors de morbidité et de mortalité cardiovasculaire<sup>10,11</sup>.





**Figure 2 : Relation entre la présence de calcifications vasculaires et la mortalité cardiovasculaire (Source : Rennenberg et al.<sup>7</sup>).**

## 2 - Facteurs de risques et pathologies associées au développement des calcifications vasculaires

La CV est une pathologie multifactorielle résultant de la présence d'un ensemble de facteurs de risques non modifiables (âge, sexe) et de facteurs de risques modifiables (alimentation, tabac...). Ces facteurs de risques participent à la survenue et à la progression des CV<sup>12</sup>.

### 2-1 Facteurs de risques non modifiables

Les CV apparaissent et s'aggravent avec l'âge. Au cours du vieillissement, les artères vont devenir plus rigides et les contraintes mécaniques, auxquelles la paroi est soumise, entraînent des modifications tissulaires majeures. Ainsi, les fibres élastiques perdent leur orientation spatiale et se fragmentent. Une fibrose réparatrice associée à une augmentation du contenu vasculaire en collagène sont alors observées. Ces phénomènes participent à l'initiation et au développement des calcifications au niveau des vaisseaux.

Le sexe est également un facteur de risque de développement de CV. En effet la survenue de CV est plus élevée chez l'homme que chez la femme. Ce risque devient significatif à partir de 50 ans chez l'homme et 60 ans chez la femme. Cette différence diminue chez la femme après la ménopause et disparaît au-delà de 75 ans.

## 2-2 Facteurs de risques modifiables

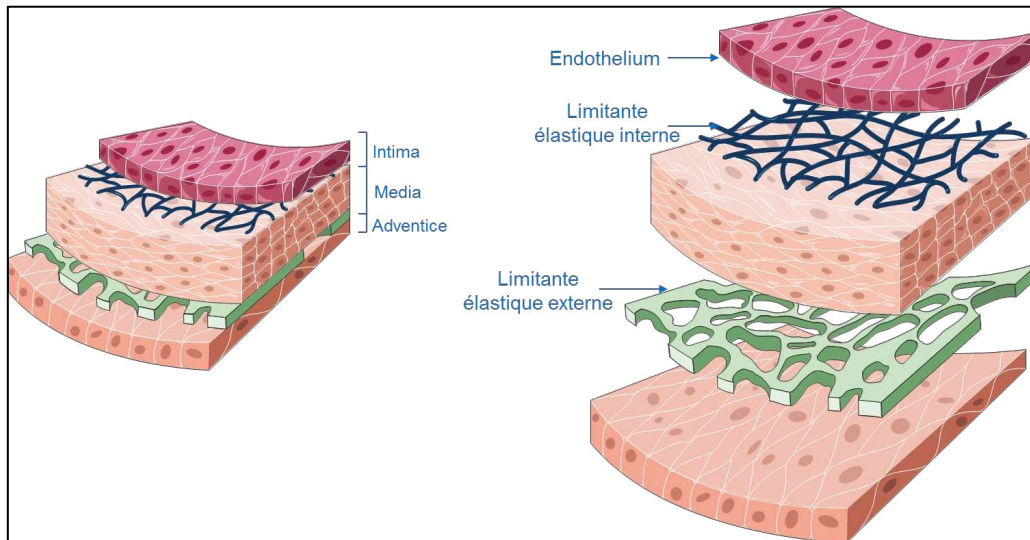
Parmi les facteurs de risques modifiables, la consommation de tabac a été associée à une augmentation du risque de CV. En effet, le tabagisme est associé à une altération de la fonction endothéliale, à des perturbations de la vasomotricité et à l'activation de l'agrégation plaquettaire. De plus, la consommation de tabac entraîne un processus pro-athérogène et pro-thrombotique<sup>13</sup>. Outre ces facteurs de risques, plusieurs études cliniques évoquent l'existence d'un lien entre l'obésité<sup>14</sup>, l'inflammation<sup>15</sup>, la dyslipidémie<sup>16-18</sup>, le stress-oxydant<sup>19</sup> et la présence, la sévérité et la progression des CV chez les patients.

## 2-3 Pathologies associées au développement des calcifications vasculaires

La présence de pathologies est également associée à une augmentation de la survenue des CV. En effet, il a été démontré qu'en activant le système rénine angiotensine, l'hypertension artérielle (HTA) favorise l'apparition des CV<sup>20-23</sup>. De la même façon, le diabète de type I ou de type II conduit à une inflammation de la paroi vasculaire contribuant au développement des CV<sup>24</sup>. L'IRC est quant à elle associée à une perturbation des fonctions endocriniennes responsables de l'homéostasie phosphocalcique des individus. L'élévation de la concentration en phosphate sérique, puissant inducteur de CV, a été également identifiée comme un facteur de risque majeur de développement des CV<sup>25-27</sup>. Ce phénomène est favorisé par une diminution de la concentration circulante de molécules et protéines connues pour inhiber le développement des CV telles que le pyrophosphate (PPi) et la fétuine-A.

### 3 - Les différentes calcifications vasculaires

Dans les artères, la calcification peut être trouvée dans les différents feuillets qui composent le vaisseau. Les vaisseaux sanguins sont principalement constitués de trois tuniques qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la media et l'adventice (**Figure 3**).



**Figure 3 : Schéma représentant les 3 tuniques des vaisseaux sanguins (Illustrations : Servier Medical Art).** De l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la media et l'adventice. L'endothélium est la couche de cellules endothéliales qui compose l'intima. Les limitantes élastiques interne et externe séparent la média respectivement de l'intima et de l'adventice.

L'intima est la couche la plus interne et la plus fine du vaisseau qui est en contact direct avec le sang. L'intima est composée d'une couche unique de cellules endothéliales. La calcification de l'intima est associée à l'athérosclérose. L'endothélium joue un rôle essentiel dans la régulation de la vasomotricité en synthétisant des molécules aux propriétés relaxantes (monoxyde d'azote (NO), prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et contractiles (Angiotensine II, endothéline...). L'endothélium joue également un rôle de garant de la santé du vaisseau en possédant des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et inhibe l'adhésion et l'aggrégation plaquettaire.

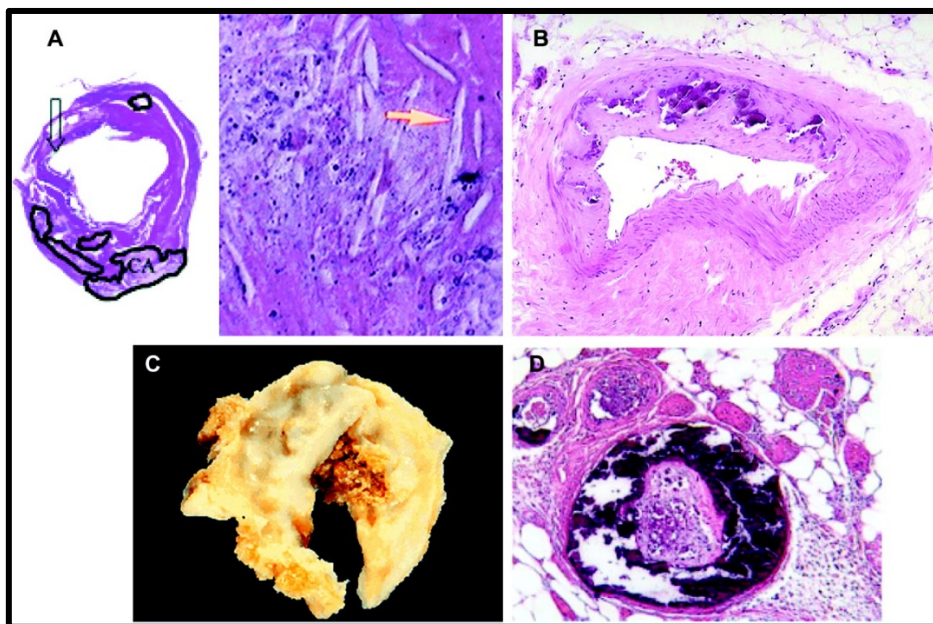
La média est la couche la plus épaisse des vaisseaux sanguins. Elle est principalement constituée de CMLV qui forment des couches appelées unités lamellaires. Ces unités lamellaires sont composées de CMLV dans une matrice extracellulaire constituée de protéines

fibreuses et élastiques (collagène et élastine). Cette couche est très organisée dans les grosses artères élastiques près du cœur, comme l'aorte, mais les fibres d'élastine sont discontinues dans les artères musculaires où une couche plus importante de CMLV est présente<sup>28,29</sup>. La calcification dans cette couche est associée à l'artériosclérose ou maladie de Mönckeberg. On rencontre principalement cette pathologie chez les patients atteints de diabète ou d'IRC<sup>30,31</sup>.

La média est limitée de part et d'autre par deux lames d'élastine appelées limitante élastique interne et limitante élastique externe.

L'adventice est la tunique située le plus à l'extérieur du vaisseau. Ce tissu est constitué essentiellement de collagène et de fibres élastiques. Il contient également les vaisseaux qui vont permettre l'apport de nutriments et d'oxygène aux artères, que l'on appelle *vasa vasorum*.

Sur la base de critères histo-anatomiques et étiologiques, différentes CV ont été référencées. Il existe quatre types de CV : l'athérosclérose, l'artériosclérose (ou maladie de Mönckeberg), les calcifications des valves cardiaques et les calciphylaxies vasculaires (**Figure 4**)<sup>32</sup>.



**Figure 4 : Les différents types de calcifications vasculaires (Source : Johnson et al.<sup>33</sup>).** A, calcification athéroscléreuse (coloration à l'hématoxyline-éosine), les zones de calcification sont entourées et les flèches indiquent les cristaux de cholestérol. B, calcification médiale ou sclérose de Mönckeberg. C, calcification de la valve aortique bicuspidale. D, calciphylaxie avec une calcification médiale massive d'un vaisseau.

### 3-1 La calcification intimale et l'athérosclérose

La calcification intimale se développe sur une plaque d'athérome existante. L'athérosclérose a été définie en 1958 par l'OMS comme « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, le tout s'accompagnant de modifications de la media ».

La première étape de l'athérosclérose est l'accumulation des LDL dans l'intima suivi de modifications oxydatives des LDL. Incontournable dans le développement de la plaque d'athérome, la présence de concentrations importantes de LDL dans la circulation sanguine est significativement associée à la présence accrue de CV des patients<sup>16,17</sup>. La présence de ce LDL, leur oxydation, facilite le recrutement local des monocytes circulants qui adhèrent et s'infiltrent dans l'endothélium. Les monocytes se différencient alors en macrophages sous l'influence du M-CSF. Les macrophages vont se gorger de LDL pour devenir des cellules spumeuses.

La présence de macrophages va entraîner une inflammation jouant un rôle prépondérant dans le développement de la plaque d'athérome. Les macrophages par libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1) favoriseraient la croissance de la plaque d'athérome et participeraient au développement des CV<sup>34</sup>. Les lipides de la plaque athéromateuse vont se regrouper et former un cœur lipidique. Parallèlement, une chape fibreuse composée de CMLV et de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) (collagène, élastine, protéoglycanes) va se former. La plaque va se développer à un rythme généralement lent et sur plusieurs années. Son expression clinique va se manifester par des problèmes ischémiques avec notamment une sténose. Une rupture de la plaque amènera des accidents cardiovasculaires (infarctus, AVC...).

### 3-2 La calcification médiale

La calcification médiale a été caractérisée par Johann Georg Mönckeberg et définit la calcification de la média des artères de petit et moyen diamètre<sup>35</sup>. La calcification médiale s'observe principalement aux extrémités des membres, mais peut aussi être observée dans des artères de plus gros diamètre chez certain patient. Elle est présente chez les patients atteints diabète de type 2 ainsi que chez les patients atteints d'IRC<sup>36,37</sup>. Contrairement à la calcification de l'intima, la calcification de la média n'engendre pas de sténose ni de thrombose<sup>35</sup>. Les

calcifications médiales sont plus fréquentes chez les hommes que chez les femmes (rapport entre sexe de 3 pour 2) et la prévalence la plus élevée a été observée chez les patients diabétiques<sup>36</sup>. Les patients présentant des calcifications médiales sont généralement plus jeunes que les patients présentant des calcifications intimales. Ces calcifications sont associées au développement concomitant de troubles du métabolisme phosphocalcique plus important<sup>38</sup>. Dans une étude réalisée en 2012, il a été démontré que chez les patients en attente d'une transplantation rénale, 39,5% des individus présentaient une calcification médiale<sup>39</sup>. Ces calcifications résultent d'un processus physiopathologique complexe impliquant principalement une trans-différenciation ostéo-chondrogénique des CMLV.

### 3-3 La calcification des valves cardiaques

Cette pathologie est due à une dégénérescence des valves aortiques. Elle aboutit au développement d'une sténose valvulaire<sup>40</sup>. L'épaississement des feuillets de la valve et leur calcification engendrent une ouverture incomplète de la valve et une obstruction de l'éjection du sang du ventricule gauche. Pour compenser ce phénomène le ventricule gauche s'hypertrophie afin de maintenir un volume d'éjection constant. A long terme, ce phénomène est responsable du développement d'une insuffisance cardiaque. Extrêmement fréquente chez les personnes âgées, cette affection touche près de la moitié des patients de plus de 80 ans<sup>41,42</sup>.

### 3-4 La calciphylaxie

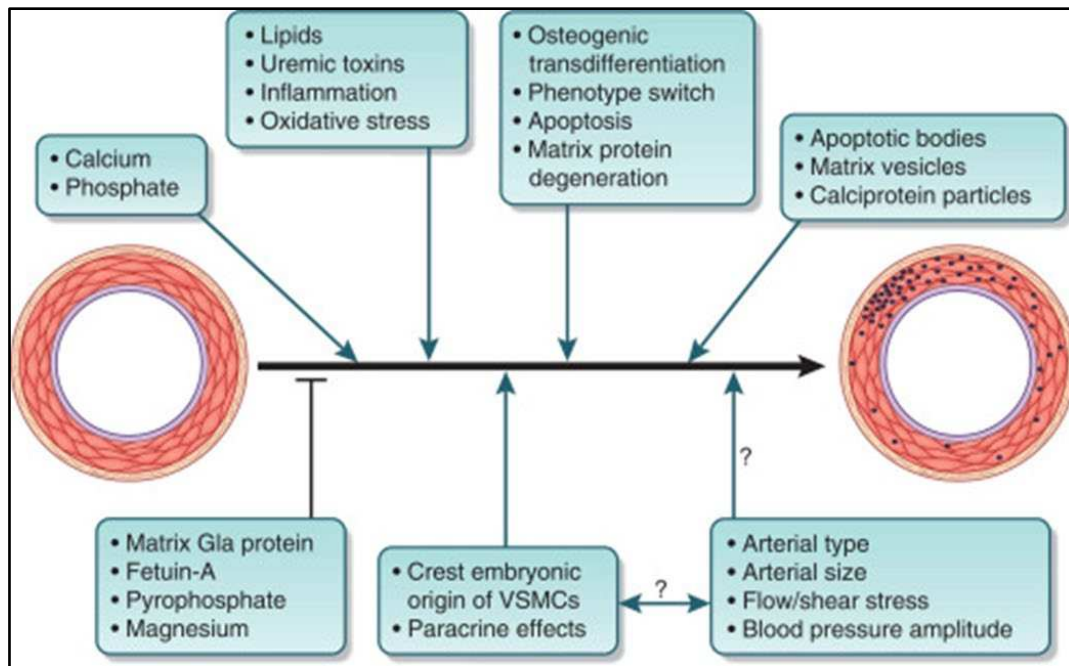
La calciphylaxie est caractérisée par un dépôt de calcium dans les tissus mous. La calciphylaxie est une pathologie affectant les artérioles et les vaisseaux de petit voire de très petit diamètre. Ce type de CV est associée à un dépôt phosphocalcique au niveau de l'ensemble des structures constitutives des vaisseaux. Elle est également associée à une hyperplasie de l'intima<sup>43,44</sup>. Bien que l'étiologie de cette affection soit mal comprise, son développement semble directement associé à une dérégulation de l'homéostasie phosphocalcique. Ce phénomène est principalement observé chez les patients IRC terminale (90% des cas)<sup>45</sup> et est surtout associé à un taux de mortalité élevé (60 à 80%)<sup>46</sup>. Cette pathologie est souvent associée à des lésions étendues des muscles squelettiques et de la peau en lien avec la formation de microthrombi,

d'occlusions thrombotiques, d'une fibrose endovasculaire et de calcifications «métastatiques» massives des artérioles<sup>47,48</sup>.

#### 4 - Les mécanismes généraux des calcifications vasculaires

Les CV ont longtemps été considérées comme un processus passif résultant de la précipitation initiale d'un excès localisé de calcium et de phosphate inorganique aboutissant à la formation secondaire de cristaux d'hydroxyapatite<sup>49</sup>. On sait aujourd'hui que l'hypothèse d'un processus de développement purement passif ne peut à elle seule expliquer l'initiation des CV et que ces dernières résultent des processus hautement régulés présentant de nombreuses similitudes avec l'ossification physiologique. En microscopie, des structures semblables à celles de l'os et du cartilage ont été décrites dans les vaisseaux. Les cristaux de calcium et de phosphate retrouvés dans la paroi vasculaire sous forme d'hydroxyapatite sont identiques à ceux de l'os<sup>5</sup>. De plus, dans les vaisseaux calcifiés on retrouve plusieurs protéines régulant la minéralisation osseuse (*Matrix Gla Protein* (MGP), ostéonectine, phosphatase alcaline (PAL), ostéocalcine (OCN), collagène de type I et II, ostéopontine (OPN))<sup>35</sup>.

Plusieurs mécanismes mettant en jeu les CMLV ont été impliqués dans la pathogenèse de la CV. La reprogrammation et la différenciation des CMLV en cellules présentant un phénotype ostéoblastique (ou trans-différenciation) et le dépôt de vésicules matricielles calcifiantes générées par les CMLV dans la paroi vasculaire ont été décrits. Ces processus sont facilités, 1) par la réduction de la concentration en composés connus comme étant des inhibiteurs naturels de la CV (PPi, fétuine-A), 2) par une augmentation du stress oxydant, 3) par une augmentation de l'apoptose des cellules présentes dans les vaisseaux et 4) par des troubles de l'homéostasie phosphocalcique. Un résumé de l'ensemble des processus pathologiques connus pour être impliqués dans l'initiation ou la progression des CV est présenté dans la figure suivante (**Figure 5**).



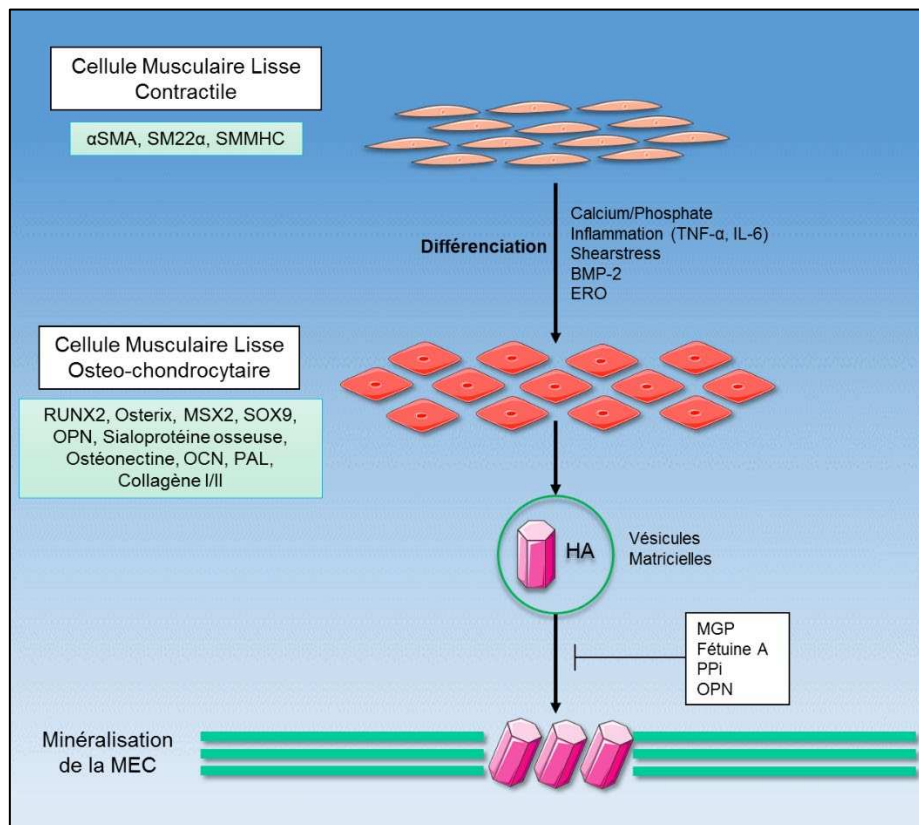
**Figure 5 : Processus impliqués dans le développement des calcifications vasculaires (Source : Schlieper et al.<sup>50</sup>).**

#### 4-1 Différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires

Les CMLV, jouent un rôle important dans la calcification des vaisseaux. En effet, elles sont capables de se différencier en cellules ayant un phénotype proche de celui des ostéoblastes, des chondrocytes ou d'adipocytes. Ce réengagement phénotypique s'engage dans la grande majorité des cas suite à l'exposition de ces cellules à un stress tel que celui induit par une hyperphosphatémie, une inflammation, un stress oxydant, l'exposition à des facteurs humoraux, les forces mécaniques (notamment le shearstress) ou encore des facteurs athérogéniques<sup>51</sup>. Les variations phénotypiques ont été mises en évidence chez l'homme ainsi que dans les modèles animaux<sup>52</sup>. En effet, il a été démontré que les CMLV perdent leur phénotype contractile, caractérisé par l'expression de la  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -Smooth Muscle Actin), de la  $\alpha$ -SM22 et de la SMMHC (Smooth Muscle Myosin Heavy Chain), et acquièrent un phénotype prosynthétique dit ostéo-chondrocytaire caractérisé par l'expression de protéines que l'on retrouve normalement dans l'os (RUNX2, OCN, OPN, PAL) (**Figure 6**). Cette trans-différenciation aura pour conséquence d'altérer la matrice et de favoriser le développement des CV. Lors du développement de la CV, les CMLV vont exprimer des facteurs de transcriptions tels que RUNX2, Osterix, MSX2 et SOX9 qui sont particulièrement importants dans la différenciation



des ostéoblastes et des chondrocytes au niveau squelettique. En perdant leur capacité contractile les CMLV sécrètent également des corps vésiculaires, appelés vésicules matricielles qui participent à la création d'un environnement propice au développement de la calcification.



**Figure 6 : Mécanismes impliqués dans la différenciation des cellules musculaires lisses en cellules de phénotype ostéo-chondrocytaire sous l'influence de différents agents inducteurs (Adapté de : Hénaout et al<sup>53</sup>).**

## 4-2 Les vésicules matricielles

Les vésicules matricielles sécrétées par les CMLV se lient à la membrane plasmique des cellules et servent de point de nucléation à l'hydroxyapatite (HA)<sup>54,55</sup>. Elles sont responsables du dépôt initial de calcium et de phosphate dans les vaisseaux sanguins. Leur mise en place et sécrétion résultent très probablement de la prise en charge d'un excès de calcium intracellulaire<sup>56</sup>. En effet les taux élevés de calcium cytosolique favorisent la translocation de l'annexine 6 à la

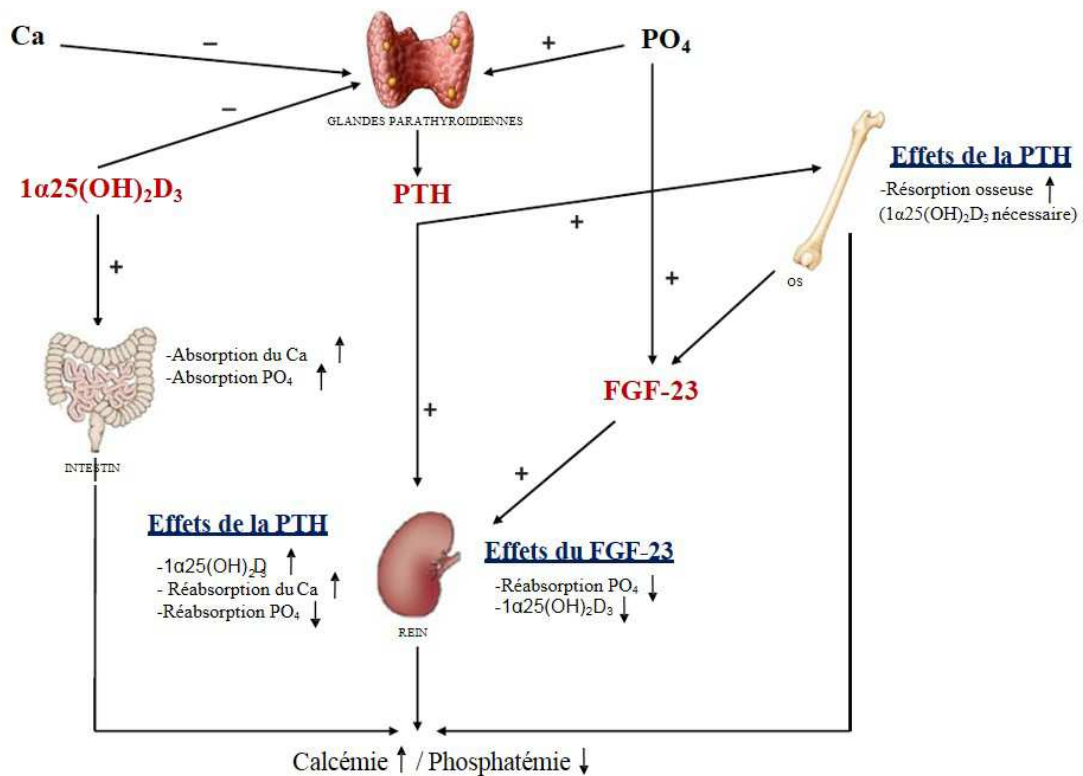
membrane plasmique des CMLV. Cela déclenche la libération de vésicules matricielles minéralisantes grâce au complexe calcium-phosphate-phosphatidylsérine<sup>57</sup>.

Il est intéressant de noter que ces vésicules sont chargées d'inhibiteurs de la calcification tels que la MGP ou la fétuine-A, dans des conditions physiologiques. Lorsqu'elles deviennent minéralisantes, les vésicules sont chargées de PAL qui en dégradant le PPi (inhibiteur endogène de la calcification) fournit une source de phosphate inorganique indispensable au développement de la CV.

### 4-3 Les dérégulations de l'homéostasie phosphocalcique

#### L'homéostasie phosphocalcique

L'homéostasie du calcium et du phosphate est le résultat de relations complexes entre la calcémie, la phosphatémie, et différentes hormones et facteurs travaillant en synergie pour maintenir la balance de ces minéraux. En **Figure 7**, on notera les rôles centraux exercés par la PTH, le calcitriol et le *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF-23) dans cette régulation.



**Figure 7 : Régulation de l'homéostasie phosphocalcique (Adapté de Saliba et al.<sup>58</sup>).** PTH : parathormone, FGF-23 : fibroblast growth factor 23, 1α25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> : calcitriol, Ca : calcium, PO<sub>4</sub> : phosphate.

La PTH est sécrétée en réponse à une hypocalcémie ou une hyperphosphatémie et agit principalement au niveau de l'os et du rein. Au niveau de l'os, elle augmente la résorption osseuse et par conséquent libère du calcium et du phosphate. Au niveau du rein, elle favorise la production de calcitriol, augmente la réabsorption du calcium dans les tubules distaux du rein et diminue la réabsorption du phosphate dans les tubules proximaux.

Le calcitriol (forme active de la vitamine D<sub>3</sub>) augmente la disponibilité du calcium et du phosphate nécessaires à la formation osseuse en favorisant l'absorption intestinale de calcium et de phosphate. Il joue également un rôle dans la diminution de la production de PTH par la stimulation de son récepteur VDR (*Vitamin D Receptor*) parathyroïdien<sup>59</sup>.

Le FGF-23 est sécrété par l'ostéocyte et agit principalement au niveau du rein. C'est une hormone qui possède une activité phosphaturiante suite à sa fixation sur son récepteur (FGF-R). Son action est en partie associée à une interaction avec un co-récepteur, appelé klotho<sup>60</sup>. Des études ont également démontré des effets de FGF-23 indépendants de klotho au niveau cardiaque<sup>61</sup> et au niveau vasculaire<sup>62</sup>.

Bien que l'action combinée et synergique de ces hormones concourt au maintien des concentrations en calcium et en phosphate au sein de l'organisme, dans certaines conditions pathologiques ce système de contrôle est dépassé. Des déséquilibres de la calcémie et/ou de la phosphatémie se mettent en place en faveur d'une augmentation du produit phosphocalcique<sup>63,64</sup>. Ce déséquilibre est retrouvé dans l'hyperparathyroïdie secondaire (HPTS) à l'IRC.

### L'insuffisance rénale chronique

L'IRC est une défaillance progressive et irréversible des néphrons. L'IRC est définie par la présence, pendant plus de 3 mois, de marqueurs d'atteinte rénale ou d'une baisse du débit de filtration glomérulaire estimé (DFG estimé) au-dessous de 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>. La défaillance du rein n'entraîne pas immédiatement de symptômes. Ceux-ci apparaissent à un stade avancé. En effet, l'IRC se décline en 5 stades reposant sur le niveau de DFG. (**Tableau 1**).

**Tableau 1 : Les cinq stades de la maladie rénale chronique (Source : Haute autorité de santé<sup>65</sup>).**

Stade	DFG (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	Définition
1	>90	IRC* avec DFG normal ou augmenté
2	Entre 60 et 89	IRC* avec DFG légèrement diminué
3	Entre 30 et 59	IRC modérée
4	Entre 15 et 29	IRC sévère
5	<15	IRC terminale

\* avec marqueurs d'atteinte rénale : albuminurie, hématurie, leucocyturie, ou anomalies morphologiques ou histologiques, ou marqueurs de dysfonction tubulaire, persistant plus de 3 mois.

Dès le stade 1 de la maladie, une forte corrélation existe entre l'IRC et le risque de complications cardiovasculaires<sup>66</sup>. Cette corrélation souligne l'importance d'un contrôle des

facteurs de risque cardiovasculaires dès le stade précoce de l'IRC. Chez les patients atteints d'IRC, la présence de calcifications est corrélée à une augmentation de la morbi-mortalité cardiovasculaire<sup>67,68</sup>.

### L'hyperparathyroïdie secondaire à l'IRC

Lorsque le DFG est inférieur à 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, l'excrétion du phosphate par le néphron est altérée. Ceci engendre une hyperphosphatémie à l'origine d'une sécrétion augmentée de PTH amenant à l'HPTS.

Ce phénomène peut avoir diverses origines :

- Comme évoqué précédemment, le phosphate peut stimuler la production de PTH par stimulation directe des glandes parathyroïdiennes.
- Le phosphate (ion monovalent) et le calcium (ion divalent) possèdent une forte affinité à se lier l'un à l'autre. Ainsi, lorsque la concentration d'un des deux ions augmente dans le sérum, le risque de liaison ionique entre eux est accru, amenant à la formation de complexes insolubles (CaHPO<sub>4</sub>). Ce processus amplifie le risque de calcifications extra-squelettiques, de calciphylaxie et de calcifications valvulaires. La formation de ce précipité phosphocalcique peut par ailleurs engendrer une diminution de la calcémie, à l'origine d'une stimulation supplémentaire de la sécrétion de PTH. Notons que la synthèse et la sécrétion de PTH peuvent être stimulées à la fois par l'hypocalcémie, l'hyperphosphatémie et la diminution de la concentration de calcitriol circulant.
- Enfin, l'hyperphosphatémie peut stimuler la production de FGF-23. Le FGF-23 réduit la synthèse de calcitriol, et donc la biodisponibilité du calcium, ce qui aboutit à une augmentation de la concentration sérique de PTH.

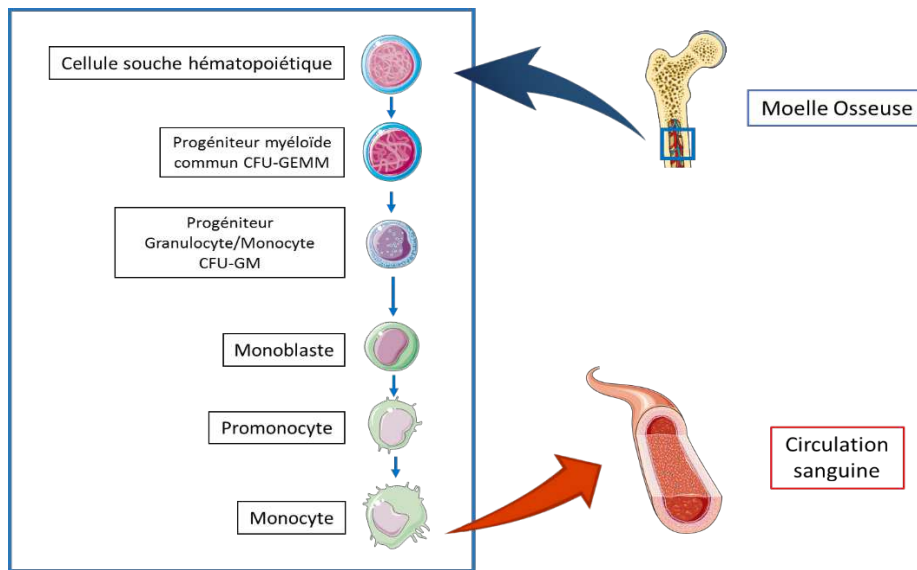
Ainsi, c'est la perte des rétrocontrôles négatifs exercés sur les glandes parathyroïdiennes suite à l'hyperphosphatémie qui est responsable de la surproduction de PTH. La surproduction de PTH engendre une augmentation de la résorption osseuse favorisant la libération de calcium et de phosphate dans le sérum. S'installe alors un cercle vicieux, par lequel l'hyperphosphatémie cause une élévation de la PTH qui amplifie l'hyperphosphatémie.

## **B - Les monocytes**

### **1 - Origine cellulaire**

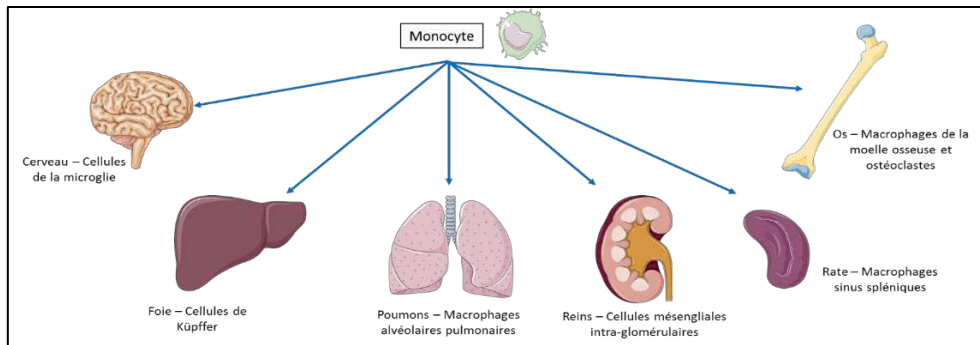
Les monocytes sont des cellules mononuclées faisant partie du système immunitaire inné, représentant environ 10% des globules blancs chez l'homme. Les monocytes sont les plus grandes cellules circulantes dans le sang. Ils mesurent entre 15 et 25 $\mu$ M de diamètre. Ils dérivent de progéniteurs et de précurseurs hématopoïétiques. Ils sont présents dans le sang pendant 1 à 2 jours au maximum, puis migrent dans les tissus où leurs caractéristiques phénotypiques et fonctions dépendront des contraintes microenvironnementales auxquelles ils seront exposés. Dans certaines conditions les monocytes peuvent garder leur phénotype lorsqu'ils entrent dans des tissus. C'est le cas au niveau de la peau et des poumons.

La monocytopenie débute par des progéniteurs très indifférenciés nommés CFU-GEMM (*Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Megakaryocyte, Monocyte*) qui, sous l'influence de diverses cytokines vont donner naissance à des progéniteurs plus différenciés<sup>69</sup>. Ces progéniteurs myéloïdes plus différenciés appelés CFU-GM (*Colony Forming Unit-Granulocyte Monocyte*), vont proliférer en présence d'IL-3 et de GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*). Ensuite, la présence supplémentaire de M-CSF (*Monocyte-Colony Stimulating Factor*) favorise la différenciation vers les progéniteurs CFU-M (*Colony Forming Unit-Monocyte*) puis vers les précurseurs monocytaires : les monoblastes puis les promonocytes (**Figure 8**). Le temps de différenciation des CFU-GEMM en monocytes médullaires est d'environ 4 à 5 jours. Le monocyte médullaire réside en moyenne une journée dans la moelle osseuse. Il migre ensuite dans le sang périphérique où il circule avant de se localiser et se différencier dans les tissus de l'organisme.



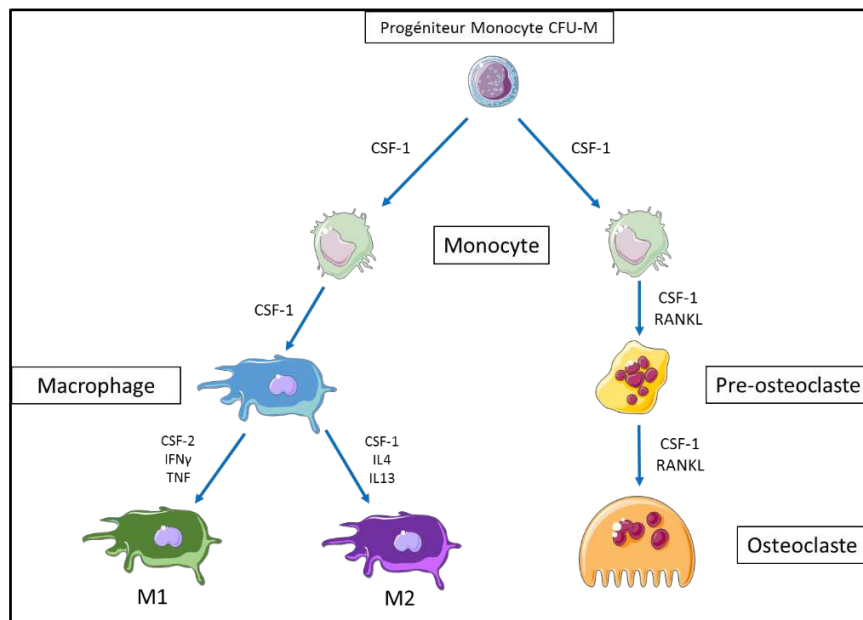
**Figure 8 : Schéma représentant la maturation médullaire du monocyte (Illustrations : Servier Medical Art).** La cellule souche hématopoïétique subit plusieurs étapes de différenciations avant de devenir un précurseur monocyttaire et enfin un monocyte.

Dans les tissus, les monocytes se différencient en macrophages. Doués d'une plasticité cellulaire importante, les monocytes s'engagent phénotypiquement en macrophages en réponse aux conditions environnementales qu'ils rencontrent. Cette différenciation est notamment contrôlée par les concentrations en cytokines ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{IL-4}$  ou  $\text{IL-13}$ ). Ils sont capables d'acquérir diverses compétences selon les organes dans lesquels ils résident (**Figure 9**). Ils possèdent des capacités de migration, de phagocytose et de production de cytokines plus élevées que les monocytes. Les macrophages exercent une fonction d'élimination des agents pathogènes, bactéries, virus et parasites mais aussi de diverses molécules comme par exemple les lipides dans le cas de l'athérosclérose. Ils participent au maintien de l'homéostasie du tissu mais également au développement de processus pathologiques tels que l'athérosclérose.



**Figure 9 : Devenir des monocytes selon les organes dans lesquels ils résident (Illustrations : Servier Medical Art).**

Le monocyte est également capable de se différencier en ostéoclaste. Parmi les cellules impliquées dans le contrôle du remodelage osseux, l'ostéoclaste est la seule cellule responsable de la résorption osseuse<sup>70</sup>. Le macrophage et l'ostéoclaste dérivent d'un progéniteur commun, le CFU-M. La différenciation s'effectue via la signalisation spécifique de RANKL (*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*) et dépend du CSF-1 (*Colony Stimulating Factor-1*) (Figure 10).



**Figure 10 : Différenciation des monocytes en macrophages ou en ostéoclastes (Illustrations : Servier Medical Art).** La capacité des monocytes à se différencier en ostéoclastes dépend de la signalisation de RANKL. En l'absence de RANKL, le monocyte se différencie en macrophage (M1 ou M2).



Lorsque le monocyte se différencie en macrophage, il se polarise et voit son phénotype se modifier sous l'influence de cytokines et de facteurs de croissance. Le monocyte se différencie en macrophage M1 sous l'influence du TNF- $\alpha$  ou de l'IFN- $\gamma$ . Les macrophages M1 sont dits « inflammatoires » car ils produisent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-12<sup>71</sup>. Lors de l'athérosclérose, les macrophages M1 favorisent la déstabilisation de la plaque amenant à des événements thrombotiques. En revanche, sous l'influence de l'IL-4 ou l'IL-13, le monocyte peut se différencier en macrophage M2. Les macrophages M2 sont associés à la cicatrisation et à la réparation des tissus. Ils sont capables de moduler la progression de la maladie en atténuant la réponse inflammatoire en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, ou encore en phagocytant les cellules en apoptose<sup>72</sup>.

## 2 - Les différentes populations de monocytes

Considérés comme une population homogène jusqu'à la fin des années 1980, les travaux de *Passlick et al.*<sup>73</sup> ont pour la première fois identifiés deux sous-populations de monocytes phénotypiquement distinctes. Ces deux sous-populations sont différenciées à partir du niveau d'expression des clusters de différenciation 14 (CD14) et 16 (CD16). On distingue une population majoritaire de monocytes exprimant fortement le CD14 (CD14<sup>++</sup>), et une population minoritaire de monocytes présentant une expression élevée de CD16. Les cellules CD16<sup>++</sup> se sont révélées être similaires aux macrophages car elles sont capables de réaliser une phagocytose efficace et de produire des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Leur capacité à produire des cytokines est cependant fortement réduite comparativement à ce que sont capables de produire les macrophages dits inflammatoires<sup>74</sup>.

Indépendamment des différences d'expression de CD14/CD16, les sous-populations monocytaires se distinguent également par leurs fonctions et caractéristiques. Les monocytes CD16<sup>++</sup> expriment les molécules d'adhésion intracellulaire ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule-1*) et le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II (HLA-DR) contrairement aux CD14<sup>++</sup>. De plus, le récepteur CD11b et les protéines de surface CD33 sont plus faiblement exprimés chez les CD16<sup>++</sup> que chez les monocytes CD14<sup>++</sup><sup>75</sup>. Il s'est avéré également que les monocytes CD16<sup>++</sup> étaient beaucoup plus nombreux dans des conditions

inflammatoires telle que la septicémie où ils constituent alors environ la moitié de la population totale des monocytes<sup>76</sup>. Il est aujourd'hui admis que ce type cellulaire est composé de sous-populations fonctionnellement différentes et que la représentativité de ces sous-populations de monocytes évolue en fonction du contexte physio-pathologique présenté par le patient<sup>77</sup>. Actuellement les monocytes sont divisés en 3 sous populations : les monocytes classiques CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> (représentant jusqu'à 90% des monocytes), les monocytes intermédiaires CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> et les monocytes non-classiques CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup><sup>78</sup>.

Ces trois sous-populations de monocytes possèdent des propriétés phénotypiques et fonctionnelles distinctes (**Tableau 2**) permettant une prise en charge différente lors d'une inflammation, y compris lors du développement de CV. Chaque sous-population présente ses propres compétences immunitaires, phagocytaires, et pro-régénératives.

**Tableau 2 : Caractéristiques et fonctions des sous-populations de monocytes humains (Sources : Pardali et al.<sup>79</sup>).**

Human monocyte subsets	Characteristic markers	Function
Classical CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>	CD14, FcγRI, CD62L, SCR-A, VEGFR1, CCR2 <sup>high</sup> CX3CR1 <sup>low</sup>	Phagocytosis, (M1) macrophages, inflammation, foam cell formation
Intermediate CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup>	CD14, CD16, Tie2, CD105, MHC II, HLA-DR, CCR2 <sup>low</sup> CX3CR1 <sup>high</sup>	(M2) macrophages, phagocytosis, vascular repair
Nonclassical CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>	CD16, HLA-DR, CD11c, CCR5, CCR2 <sup>low</sup> CX3CR1 <sup>high</sup>	(M1 and M2) macrophages, phagocytosis, dendritic cells

Les **monocytes classiques** (CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup>) expriment un nombre élevé de récepteurs de chimiokine 2 (CCR2, récepteur au MCP-1), CXCR1, CXCR2, CXCR4 et CD62L (L-selectine)<sup>77,80</sup>. Ils expriment par contre une faible quantité de CX3CR1 (récepteur de la fractalkine, CX3CL1) et de CCR5<sup>80,81</sup>. Ils produisent une large gamme de cytokines et de chimiokines telles que : l'IL-10, l'IL-6, l'IL-8, le TNF-α, l'IL-1β et le MCP-1<sup>80,82</sup>. Les monocytes classiques présentent également une importante activité phagocytaire caractérisée par l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines participant au processus de phagocytose<sup>82,83</sup>. Ils sont également caractérisés par une importante expression de gènes codant pour des protéines antimicrobiennes, suggérant un rôle crucial dans les mécanismes de défense

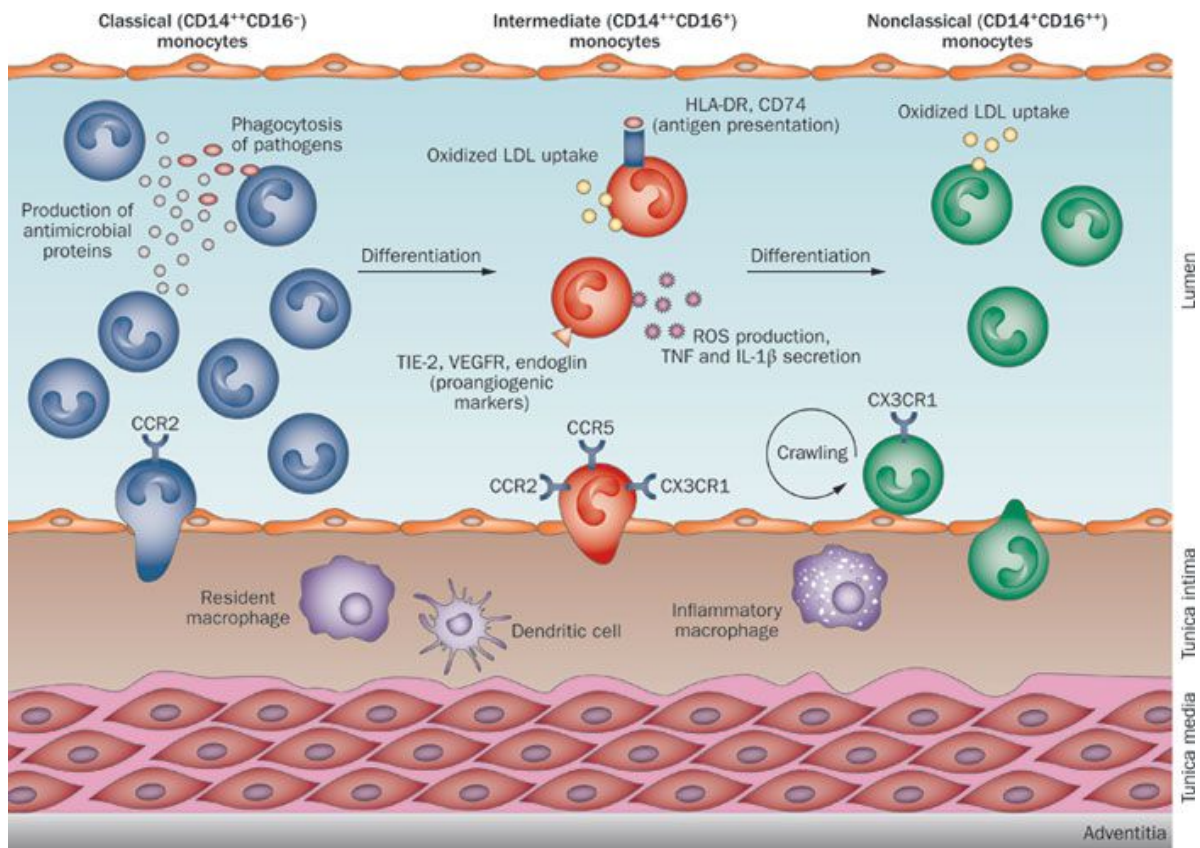
immunitaire contre les pathogènes. Enfin, les monocytes classiques expriment des gènes associés à l'angiogenèse (THBS1, de la famille des thrombospondines ; ANG, ou angiogénine, puissant stimulateur de la formation de vaisseaux sanguins), à la cicatrisation et à la coagulation (NRG1, de la famille des facteurs de croissance épidermique ; F13A1, codant pour la sous-unité A du facteur de coagulation XIII), ils ont donc un rôle important dans la réparation des tissus<sup>80,82,84</sup>.

Contrairement aux monocytes classiques, les **monocytes non-classiques** CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> n'expriment pas ou peu CCR2 et CD62L<sup>77,85</sup>. Ils se distinguent des monocytes classiques par l'expression d'une quantité élevée de CX3CR1. Les cellules CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> sont considérées comme des sentinelles et impliquées dans la surveillance des tissus. Leur capacité à parcourir la surface de l'endothélium leur permet de contrôler l'interface entre le sang et l'endothélium afin de détecter de manière sélective les cellules infectées ou endommagées. Des expériences *in vitro* ont d'ailleurs démontré que les monocytes CD16<sup>++</sup> étaient beaucoup plus mobiles que les CD16<sup>-</sup>. De plus, des gènes associés au remodelage du cytosquelette (WASP2, VASP) ont d'ailleurs été caractérisés chez les monocytes non-classiques<sup>80,83,86,87</sup>. Sous stimulation par le lipopolysaccharide (LPS), les monocytes non-classiques sont capables de produire des quantités importantes de cytokines inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 ou le MCP-1<sup>77,88,89</sup>. Les monocytes CD16<sup>+</sup> sont également appelés « monocytes inflammatoires » en raison de l'augmentation de leur nombre dans la circulation de patients en conditions pathologiques comme dans l'athérosclérose<sup>90</sup>, l'arthrite rhumatoïde<sup>91</sup>, le cancer<sup>92</sup> ou encore la glomérulonéphrite<sup>93</sup>.

Depuis le début des années 2000, de nombreuses études ont mis en évidence une troisième sous-population : les **monocytes intermédiaires** CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup>. Les monocytes intermédiaires partagent certaines caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des monocytes classiques et non-classiques. Ils expriment simultanément CCR1, CCR2 et CXCR2. Ils expriment également CX3CR1 qui est abondamment exprimé par les monocytes non-classiques et peu exprimé chez les monocytes classiques. Les monocytes CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> peuvent être identifiés par leur expression de CCR5, ce qui suggère qu'ils pourraient être attirés par des lésions athéromateuses dépendantes de CCR5<sup>77,83,94</sup>. Les monocytes intermédiaires possèdent, tout comme les monocytes non-classiques, un potentiel inflammatoire élevé et sont capables de

produire du TNF- $\alpha$  ou de l'IL-1 $\beta$ . Des études ont montré que cette population est impliquée dans des pathologies comme l'athérosclérose<sup>95</sup> ou encore l'infection par le VIH<sup>96</sup>.

La plupart des études admettent que les monocytes quittent la moelle osseuse en tant que monocytes classiques, qui ont une capacité antimicrobienne élevée en raison de leur puissante capacité de phagocytose et de leur production accrue de protéines antimicrobiennes. Les monocytes classiques peuvent soit envahir directement le site inflammatoire pour s'y différencier en macrophages et/ou cellules dendritiques, soit se différencier en monocytes intermédiaires dans la circulation (**Figure 11**). La forte expression de certains récepteurs et marqueurs, tels que l'HLA-DR, prédispose les monocytes intermédiaires à la présentation d'antigène. De plus, les monocytes intermédiaires produisent des concentrations élevées d'ERO et de médiateurs inflammatoires (tels que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ ) qui régulent positivement l'expression de divers récepteurs de chimiokines connues pour jouer un rôle dans l'athérosclérose (tels que CCR2, CCR5 et CX3CR1). Les monocytes intermédiaires ont une grande capacité d'absorption des LDL oxydés; et ils possèdent une capacité pro-angiogénique, comme l'indique l'expression de Tie2 et de VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*). Les monocytes intermédiaires peuvent se différencier en monocytes non-classiques, qui « patrouillent » à l'interface endothélium-sang. Les monocytes intermédiaires et non-classiques peuvent envahir l'intima en renouvelant le pool de macrophages et de cellules dendritiques.



**Figure 11 : Rôles potentiels des différentes sous-populations monocytaires (Sources : Heine et al.<sup>97</sup>).** Les monocytes se divisent en trois sous-populations : classiques, intermédiaire et non-classiques. Les monocytes classiques ont une forte activité anti-microbienne, ils peuvent infiltrer le tissu inflammé ou se différencier en monocytes intermédiaires. Les monocytes intermédiaires produisent des cytokines inflammatoires et régulent des récepteurs liés à l'athérosclérose. Les monocytes non-classiques sont des sentinelles qui patrouillent l'endothélium. Les monocytes intermédiaires et non-classiques sont capables d'infiltrer l'intima afin de se différencier en macrophages.

### 3 - Rôle des monocytes

Malgré leur rôle principal dans la défense immunitaire et dans les mécanismes de réparation tissulaire, les monocytes sont également impliqués dans des pathologies telles que les maladies auto-immunes, les pathologies cardiovasculaires ainsi que le cancer.

#### 3-1 Rôle des monocytes en conditions inflammatoires

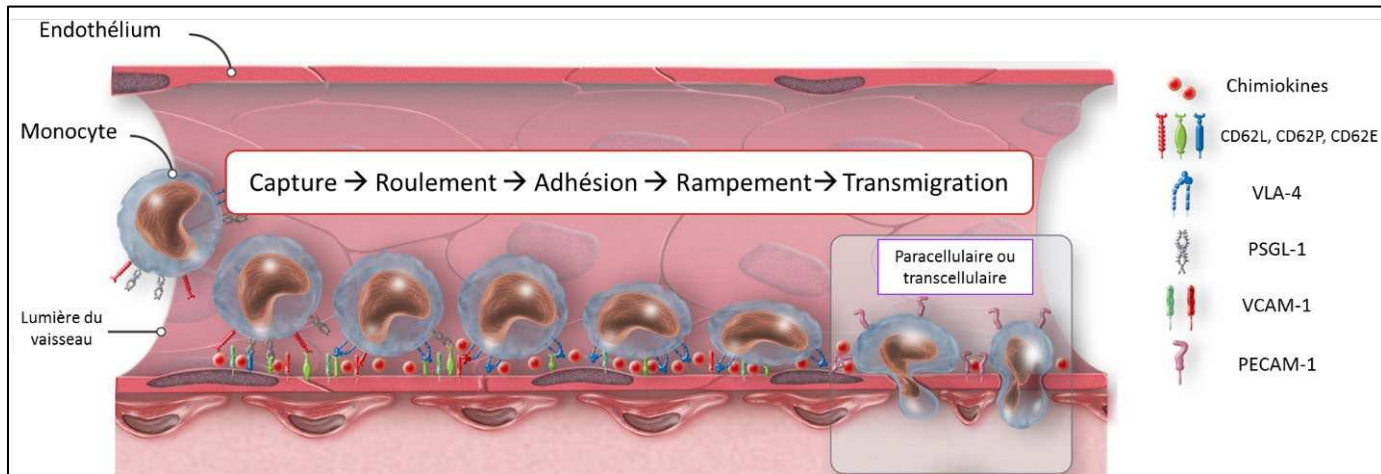
Le recrutement des cellules immunitaires sur les sites inflammatoires s'effectue au travers de l'activation de récepteurs des chimiokines. L'expression des chimiokines et de leurs récepteurs est régulée par les stimuli inflammatoires<sup>98</sup>. Le CCR2, principalement exprimé par les

monocytes classiques, se lie à son ligand (MCP-1) sécrété par les cellules endothéliales. L'interaction CCR2/MCP-1 participe à la fois à la mise en circulation des monocytes à partir de la moelle osseuse et à leur recrutement au niveau tissulaire<sup>99-102</sup>. CCR1 et CCR5 sont également impliqués dans le recrutement des monocytes dans les tissus inflammatoires<sup>102</sup>.

La mobilité des monocytes dans les tissus non lymphoïdes et lymphoïdes dépend également de molécules d'adhésion<sup>103</sup>. Ainsi, la liaison des sélectines (CD62L, CD62P, CD62E) au niveau des cellules endothéliales avec leur ligand PSGL-1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*) est cruciale pour l'infiltration des monocytes dans les tissus<sup>104</sup>. D'autres molécules d'adhésion, comme le VLA-4 (*Very Late Antigen-4*) ou Mac-1, ainsi que leurs ligands, VCAM-1 et ICAM-1, participent à l'infiltration des monocytes<sup>105,106</sup> (**Figure 12**). Certaines pathologies vasculaires, telle que l'athérosclérose, sont associées à une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 au niveau de l'endothélium ce qui participe à l'augmentation du recrutement des monocytes circulants au niveau de la paroi vasculaire. Le contact avec l'endothélium induit une hausse de l'expression de HLA-DR par les monocytes, facilitant leur capacité à présenter des antigènes<sup>104</sup>. En conditions inflammatoires ou infectieuses, on observe un afflux rapide de monocytes classiques<sup>107-109</sup>. Outre les chimiokines et les cytokines, la sécrétion et l'activité de certaines métallo-protéases matricielles (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13, MMP-14) sont directement impliquées dans l'invasion tissulaire<sup>110,111</sup>. A l'inverse, des molécules telle que l'IL-10 semblent contrarier la migration des monocytes au sein des tissus. Produite par des cellules dérivées de monocytes résidant dans les tissus, l'IL-10 bloquerait en partie le recrutement des monocytes notamment en inhibant l'action de MCP-1<sup>112</sup>.

Le recrutement rapide des monocytes est crucial pour inhiber la propagation de l'infection et passe par la clairance des agents pathogènes, le recrutement d'autres cellules immunitaires circulantes et l'activation de protéine adaptative de ces cellules. Pour éviter de trop endommager les tissus en raison de l'afflux important de cellules immunitaires et de réactions inflammatoires, le contrôle de l'inflammation est indispensable. Lorsque ce contrôle est insuffisant, le processus inflammatoire perdure localement. Après invasion tissulaire, le suivi des sous-populations monocytaires est rendu difficile par la régulation des marqueurs (CD16 et CX3CR1) et l'acquisition de nouveaux marqueurs phénotypiques liés à l'acquisition de leurs nouvelles fonctions biologiques<sup>113</sup>. La compréhension des mécanismes moléculaires régulant

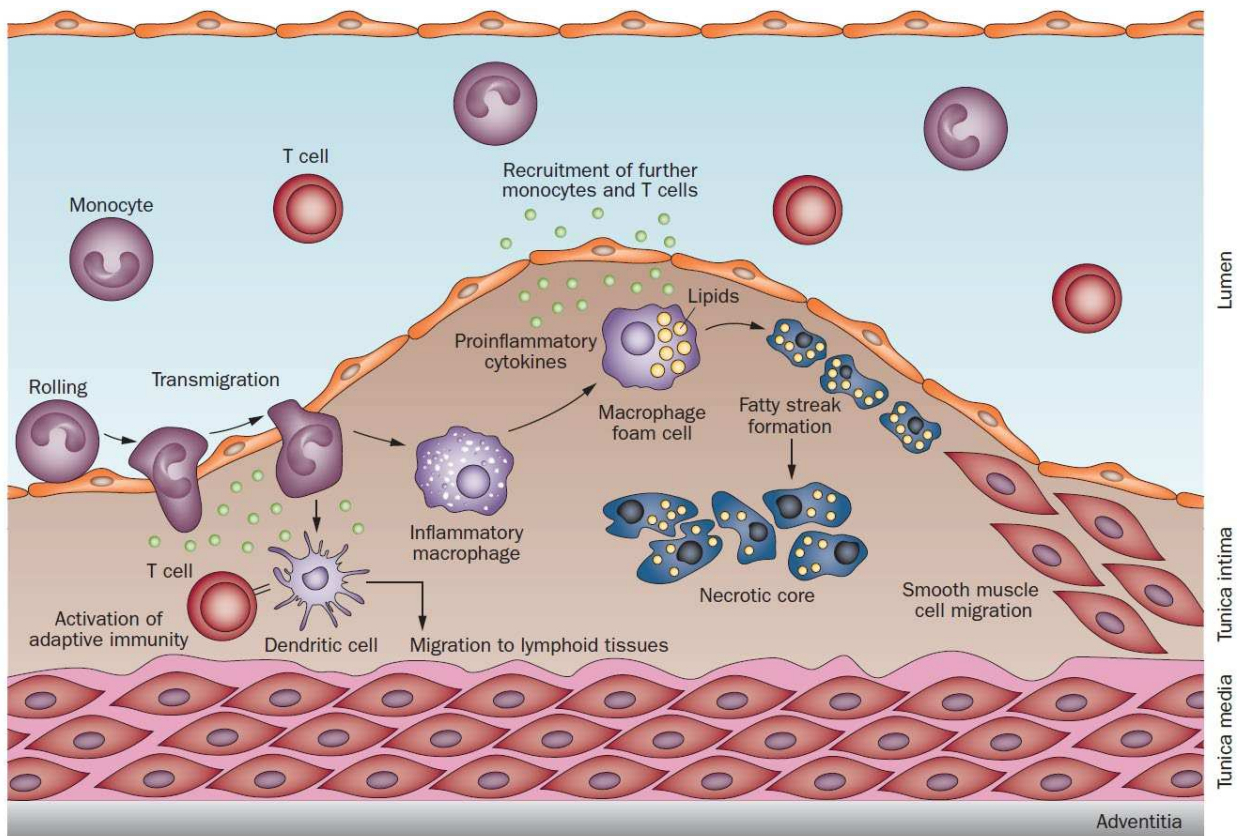
cet engagement phénotypique apporterait un éclairage nouveau à de nombreuses pathologies dans lesquelles les monocytes sont impliqués, comme c'est le cas par exemple dans la pathologie athéromateuse et/ou le processus de CV.



**Figure 12 : Représentation du recrutement des monocytes au niveau de l'endothélium** (Adapté de : Gerhardt et al.<sup>114</sup>). Le recrutement des monocytes au niveau de l'endothélium s'effectue en plusieurs étapes : capture, roulement, adhésion, rampement et transmigration endothéliale. Les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhésion et des chimiokines qui interagissent avec des ligands monocytaires permettant l'infiltration des monocytes.

### 3-2 Rôle des monocytes dans les pathologies vasculaires

Les monocytes jouent un rôle important dans l'initiation de pathologies vasculaires comme l'athérosclérose. Lors de l'initiation de cette pathologie, une inflammation se crée au niveau de l'endothélium. Les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhésion et sécrètent des composés chimioattractants facilitant l'attachement et l'infiltration des monocytes circulants dans l'intima. Dans l'espace sous-endothélial les monocytes vont se différencier en macrophages, se gorger de lipides et devenir des cellules spumeuses. Ces macrophages vont alors produire des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et, par conséquent, de nouveaux monocytes vont être attirés de la lumière du vaisseau vers l'intima (**Figure 13**).



**Figure 13 : Rôle des monocytes dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose (Source : Heine et al.<sup>97</sup>).**

La migration des CMLV vers l'intima favorise également le processus athérogène. Ce phénomène va se répéter et favoriser la progression de la plaque athéromateuse jusqu'à sa rupture. Il a été démontré, dans les modèles murins, que l'inhibition combinée de CCR2, CCR5 et CX3CR1 permet de réduire le recrutement des monocytes dans la paroi vasculaire et par conséquent la taille des plaques athéromateuses et l'athérogénèse<sup>115</sup>.

Plusieurs études ont démontré que les monocytes CD16<sup>+</sup> (intermédiaires et non classiques) étaient impliqués dans le développement de l'athérosclérose<sup>90,116</sup>. Ainsi, le nombre de monocytes CD16<sup>+</sup> est corrélé chez ces patients avec les facteurs de risques cardiovasculaires. Une réserve peut être néanmoins émise. En effet, les études mentionnées ci-dessus décrivent l'ensemble des populations CD16<sup>+</sup> sans faire la distinction entre les monocytes intermédiaires et les monocytes non-classiques. Or, il existe une hétérogénéité importante des monocytes et seuls les monocytes intermédiaires ont pu être identifiés comme prédicteurs d'évènements cardiovasculaires défavorables et de décès<sup>97</sup>. Rogacev et al.<sup>94</sup> ont analysé de manière

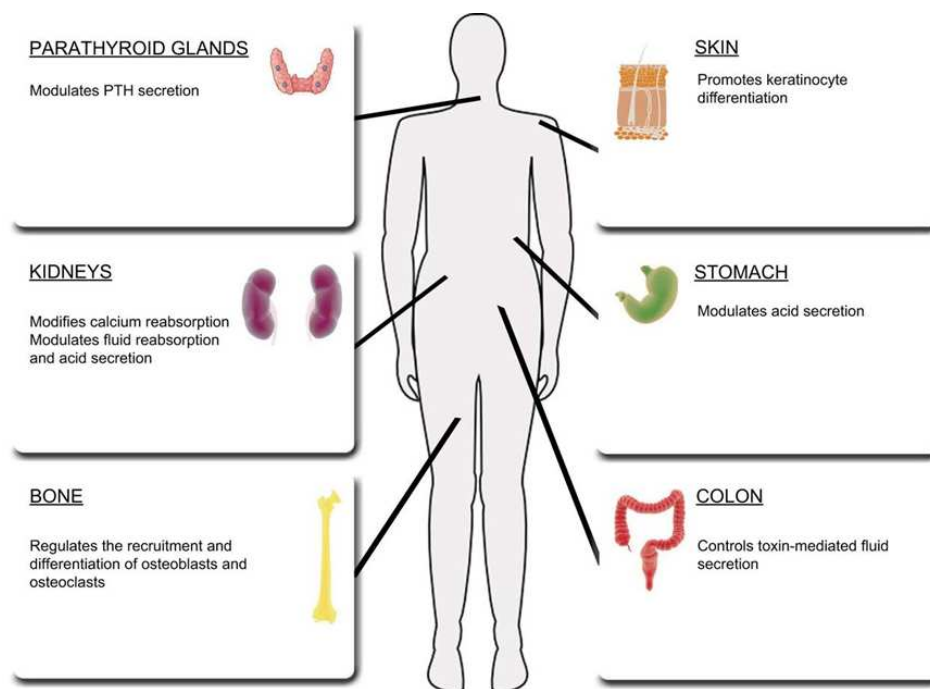


prospective les sous-populations monocytaires chez des patients IRC non dialysés. Dans cette cohorte, seuls les monocytes intermédiaires étaient associés aux évènements cardiovasculaires. Une autre étude réalisée par les mêmes auteurs a confirmé ces résultats <sup>117</sup>. Une étude récente a par ailleurs démontré que les monocytes intermédiaires étaient associés à la sévérité de l'IRC<sup>118</sup>.

## C - Le récepteur sensible au calcium : CaSR

### 1 - Structure du récepteur sensible au calcium

Le CaSR est une glycoprotéine appartenant à la famille des récepteurs à sept segments transmembranaires couplés à une protéine G (RCPG) de classe C. Cette classe se différencie des classes A et B de RCPG, entre autre, par la présence d'un large domaine extracellulaire de 450 à 500 acides aminés, en moyenne<sup>119</sup>. Le CaSR a été cloné à partir de glandes parathyroïdiennes bovines en 1993<sup>120</sup>. Il est exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme au sein duquel il participe au maintien de l'homéostasie calcique ainsi qu'à la régulation de nombreux phénomènes biologiques associés à une variation de la concentration en calcium extracellulaire<sup>121</sup> (**Figure 14**). En effet, le CaSR permet à toute cellule qui l'exprime de détecter la concentration en calcium extracellulaire présent dans son proche environnement et de mettre en place une réponse adaptée à celle-ci.



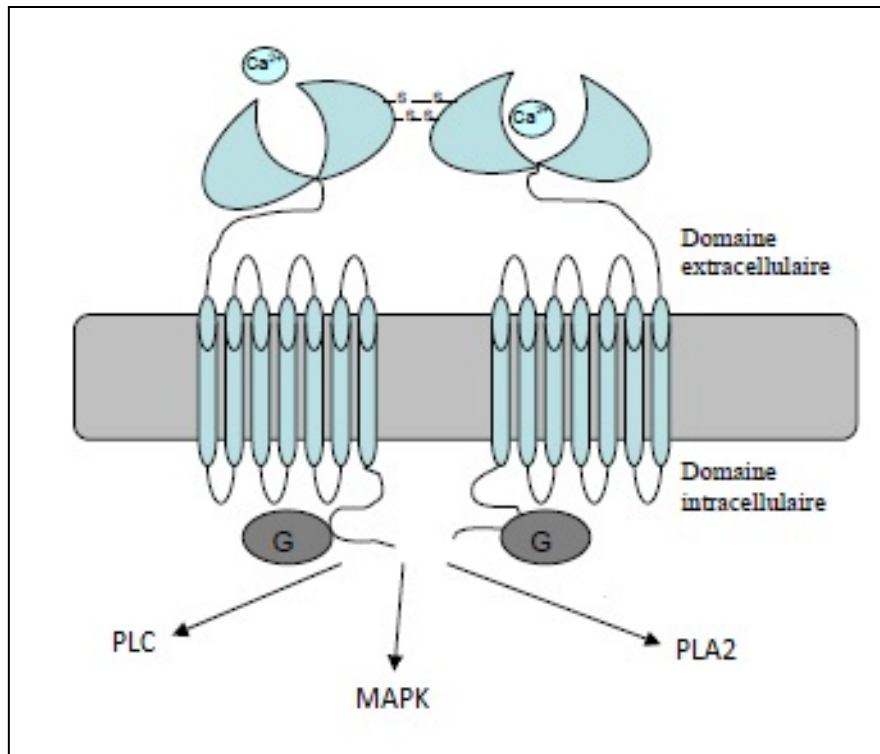
**Figure 14 : Les différentes fonctions physiologiques du CaSR dans l'organisme (Sources : Alfadda et al.<sup>122</sup>). Le récepteur sensible au calcium est exprimé dans une grande variété de tissus. Sa fonction physiologique principale est d'assurer la régulation de l'homéostasie calcique dans l'organisme.**

Le CaSR humain est un polypeptide de 120 kDa qui se compose de 1078 acides aminés. Comme le montre la **Figure 15**, le CaSR possède trois grands domaines structuraux<sup>123</sup> :

-un large **domaine extracellulaire** localisé à la partie N-terminale, cette partie est composée de 612 acides aminés et se présente sous la forme d'un domaine communément appelé « Venus Flytrap »<sup>124</sup>. Ce domaine possède 11 sites de N-glycosylation qui sont nécessaires à l'expression du récepteur à la surface des cellules<sup>124</sup>. Il possède également une zone riche en cystéine qui participe aux repliements tridimensionnels des récepteurs conduisant à leur homodimérisation<sup>125</sup>. La liaison du ligand au domaine extracellulaire du récepteur provoque un repli de la molécule qui passe d'une conformation ouverte inactive à une conformation fermée active<sup>126,127,128</sup>.

-un **domaine transmembranaire** composé de 7 hélices  $\alpha$  caractéristiques des RCPG. Il possède 250 acides aminés et permet le maintien de la conformation tridimensionnelle du CaSR et assure la transduction des signaux extracellulaires vers l'espace intracellulaire<sup>129,130</sup>. En effet, les variations de la concentration en calcium extracellulaire induisent l'activation des voies de signalisation intracellulaires, incluant les voies de la phospholipase C (PLC), de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) et des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) dont les protéines ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases*), la protéine kinase A (PKA), la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) ou encore p38<sup>129,131</sup>.

-un **domaine intracellulaire** qui est localisé au niveau C-terminal, composé de 216 acides aminés. Il possède 5 sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) et 2 sites de phosphorylation par la PKA<sup>130,132</sup>. La phosphorylation de ces sites serait responsable d'un rétrocontrôle négatif exercé par la cellule sur l'activité du CaSR.



**Figure 15 : Représentation schématique du CaSR sous sa forme active (Sources : Saidak Z. et al<sup>129</sup>).** Le CaSR activé induit une transduction du signal par son interaction avec les protéines G, s'ensuit une activation des voies de la phospholipase C (PLC), de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) et des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*).

## 2 - Les rôles biologiques du CaSR

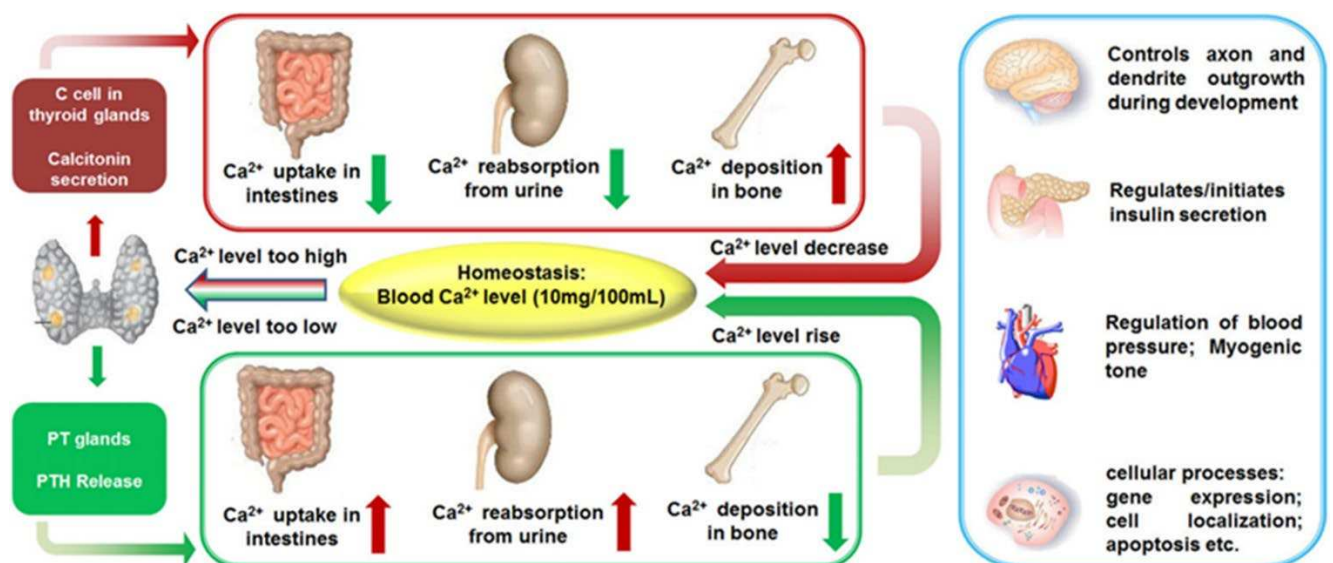
Le rôle principal du CaSR est de maintenir l'homéostasie phosphocalcique. Il est exprimé dans tous les tissus participant à l'homéostasie phosphocalcique comprenant les cellules parathyroïdiennes, les reins, l'os et l'intestin<sup>133</sup> (**Figure 16**).

Le CaSR régule la sécrétion de la PTH par les glandes parathyroïdes et la sécrétion de calcitonine par les cellules C thyroïdiennes lors de la détection de variation de la concentration de calcium dans le liquide extracellulaire<sup>134</sup>. Découvert dans les cellules parathyroïdiennes, le CaSR est responsable du rétrocontrôle négatif de la sécrétion de PTH<sup>120</sup>. Ainsi, en condition d'hypercalcémie, la stimulation du CaSR par le calcium extracellulaire permet de diminuer la sécrétion de PTH, et inversement en condition d'hypocalcémie<sup>135</sup>. Au niveau de la membrane plasmique des cellules parathyroïdiennes, le CaSR est localisé dans des invaginations appelées caveolae<sup>136</sup>. Ces invaginations sont abondantes en caveolin-1 qui est une protéine structurale

qui interagit avec la filamine A<sup>137</sup>. La filamine A a une interaction avec le CaSR et le protège de la dégradation<sup>138</sup>. Le CaSR est également impliqué dans le changement morphologique des cellules via son interaction avec la filamine A<sup>139,140</sup>.

Dans le rein le CaSR est exprimé de manière ubiquitaire<sup>141,142</sup>. Le CaSR permet la régulation de l'homéostasie du calcium et du phosphate ainsi que l'excrétion urinaire et la réabsorption du calcium<sup>143</sup>. On retrouve également le CaSR dans le tractus gastro-intestinal (œsophage, estomac, intestin, côlon)<sup>144,145</sup>. Au niveau de ce système, l'activité du CaSR est associée à une augmentation de la phosphorylation d'ERK, une mobilisation du calcium intracellulaire, la sécrétion d'IL-8, la sécrétion d'acide gastrique<sup>146-148</sup> ainsi qu'à la prolifération et la différenciation cellulaire<sup>149,150</sup>.

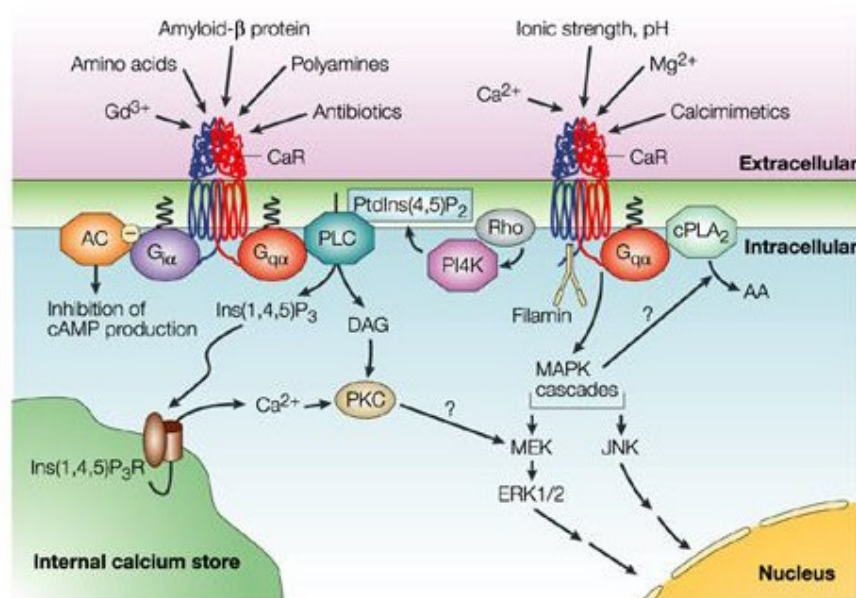
Le CaSR a été mis en évidence dans le tissu osseux, il est notamment exprimé par les ostéoblastes et les ostéoclastes<sup>151</sup>. Le CaSR est impliqué dans la prolifération des ostéoblastes via la signalisation JNK<sup>152,153</sup>, et participe à la fois à la différenciation et à l'apoptose des ostéoclastes via la PLC<sup>154</sup>. En effet, il a été démontré qu'une concentration élevée de calcium extracellulaire augmente l'apoptose des ostéoclastes<sup>155</sup>.



**Figure 16 : CaSR et régulation de l'homéostasie phosphocalcique (Source : Zhang et al.<sup>156</sup>).** Deux hormones (PTH et calcitonine) régulent l'homéostasie du calcium via plusieurs organes. Si la concentration de Ca<sup>2+</sup> diminue, la PTH est libérée par les glandes parathyroïdiennes. La PTH stimule ensuite l'absorption du Ca<sup>2+</sup> par l'intestin, la libération de Ca<sup>2+</sup> par les os et la réabsorption du Ca<sup>2+</sup> par le système urinaire. Si la concentration en Ca<sup>2+</sup> augmente, la régulation opposée se produira afin de maintenir une concentration de Ca<sup>2+</sup> dans le sang entre 1,1 et 1,4mmol.L<sup>-1</sup>.

### 3 - Adressage membranaire et signalisation du CaSR

Le CaSR fait partie d'un petit groupe de RCPG capable de fonctionner de manière continue en présence de ses agonistes. Une fois sur la membrane plasmique de la cellule, le CaSR est capable de produire une réponse intracellulaire tant que ses agonistes sont présents<sup>157-159</sup>. Il a été démontré, dans une lignée de cellules embryonnaires de rein humaines (HEK-293), que le taux d'expression du CaSR à la membrane plasmique est lié à la concentration de calcium extracellulaire ou de modulateurs allostériques dans le milieu de culture<sup>157</sup>. La liaison du CaSR avec son agoniste entraîne l'activation de voies de signalisation intracellulaire complexes (Figure 17).



**Figure 17 : Les voies de signalisation activées par le CaSR (Source : Hofer et Brown<sup>160</sup>).**

Schéma récapitulant les voies de signalisation activées par le CaSR lorsqu'il est exposé à un agoniste.

L'exposition du CaSR à un agoniste provoque l'activation de la PLC à travers l'activation de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G hétérotrimérique de type q ( $G_{\alpha q}$ ) ou de type 11 ( $G_{11\alpha}$ )<sup>161</sup>. Ces interactions vont aboutir à la production d'inositol-4,5-triphosphate (Ins (1,4,5)P<sub>3</sub> ou IP<sub>3</sub>) et de diacylglycerol (DAG)<sup>162</sup>. La fixation de l'IP<sub>3</sub> sur son récepteur et la production de DAG favorise l'activation de la PKC<sup>132,163</sup>. Par ailleurs le CaSR interagit non seulement avec  $G_{\alpha q}$  et

G<sub>11α</sub> mais aussi avec G<sub>iα</sub> ce qui entraîne l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) et une réduction des niveaux d'AMP cyclique (AMPC)<sup>164</sup>.

## 4 - Les modulateurs du CaSR

Il existe un grand nombre de ligands qui peuvent se fixer sur le CaSR parmi lesquels on trouve les modulateurs orthostériques et les modulateurs allostériques. Les modulateurs orthostériques sont capables d'activer le CaSR par leur seule fixation alors que les modulateurs allostériques nécessitent la fixation d'agonistes orthostériques pour produire leurs effets. Il est nécessaire de préciser que les modulateurs allostériques sont soit des activateurs soit des inhibiteurs du CaSR (**Tableau 3**).

**Tableau 3 : Les différents modulateurs du CaSR (Adapté de : Diez-Fraile et al.<sup>165</sup>).**

Modulateurs orthostériques	Modulateurs allostériques activateurs	Modulateurs allostériques inhibiteurs
Ca <sup>2+</sup> Ions di et trivalents Polyamines Antibiotiques aminosides Peptides β-amyloïdes	Acides aminés lévogyres Calcimimétiques	Calcilytiques

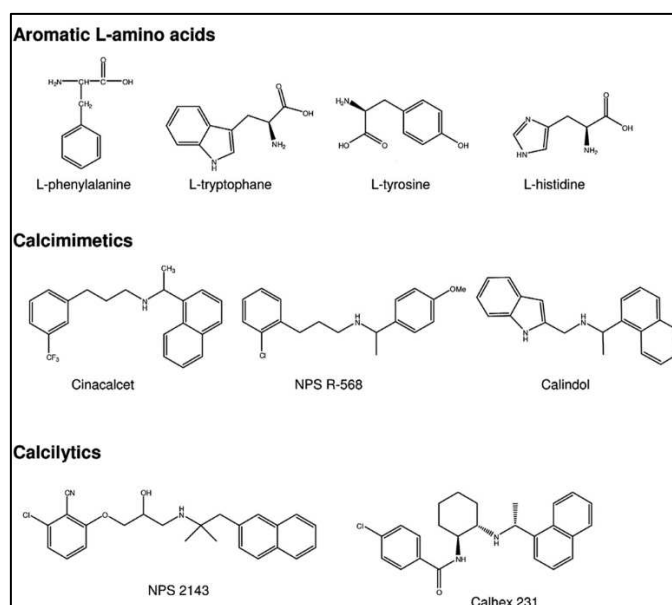
### Les modulateurs orthostériques

Les modulateurs orthostériques du CaSR sont principalement des cations di- ou trivalents incluant le calcium (Ca<sup>2+</sup>). Parmi ces cations on retrouve le béryllium (Br<sup>2+</sup>), le strontium (Sr<sup>2+</sup>), le magnésium (Mg<sup>2+</sup>), le baryum (Ba<sup>2+</sup>), le gadolinium (Gd<sup>3+</sup>) ou encore le lanthane (La<sup>3+</sup>). On retrouve également des polyamines (spermine, spermidine, putrescine), des antibiotiques de la famille de aminosides (néomycine, gentamycine) et les peptides β-amyloïdes<sup>166,167</sup>. Ces modulateurs se fixent sur le domaine extracellulaire « Venus Flytrap », le terme orthostérique qualifiant la conformation primaire et non modifiée du site de fixation. Pour le cas du calcium, il a été démontré qu'il existe 5 sites de fixation sur le CaSR<sup>168,169</sup>. Le calcium se fixe

majoritairement sur les sites du domaine extracellulaire du CaSR alors qu'il peut se fixer également sur des sites du domaine transmembranaire<sup>130</sup>.

### Les modulateurs allostériques

La fixation des modulateurs allostériques s'effectue en dehors du site orthostérique et engendre un changement de conformation tridimensionnelle du CaSR. Ce changement affecte l'efficacité et/ou l'affinité de la liaison avec les modulateurs orthostériques. Les modulateurs allostériques les plus connus du CaSR sont les acides aminés aromatiques (L-phénylalanine, L-tryptophane, L-tyrosine et L-histidine)<sup>129</sup> (**Figure 18**).



**Figure 18 : Structure des différents modulateurs allostériques du CaSR (Source : Saidak et al.<sup>129</sup>).**

- Calcimimétique et calcilytique

Parmi les modulateurs allostériques, deux agents pharmacologiques ont été développés : les calcimimétiques et les calcilytiques. Les calcimimétiques sont des composés organiques qui agissent comme modulateurs allostériques positifs permettant l'activation du CaSR alors que les calcilytiques sont des antagonistes allostériques du CaSR<sup>170,171</sup>. Ils sont composés d'un cycle



aromatique et d'un groupement amine chargé positivement et partagent des similarités avec les acides aminés aromatiques vus précédemment (**Figure 18**).

Les premiers calcimimétiques identifiés sont de nature phénylalkylamines. C'est le cas du composé utilisé comme agoniste allostérique du CaSR dans ce travail : **le NPS-R568**<sup>172,173</sup>. Aujourd'hui disponible sous deux formes médicamenteuses (le Cinacalcet chlorydrate, Mimpara® et l'Etelcacétide chlorydrate, Parsabiv®), les calcimimétiques sont notamment utilisés pour le traitement de l'hyperparathyroïdie secondaire à l'IRC. Les calcimimétiques exercent leur effet thérapeutique en inhibant la synthèse et la sécrétion de PTH au niveau parathyroïdien et permettent le contrôle du produit phosphocalcique<sup>174</sup>.

Les calcilytiques sont, quant à eux, des substituts de phényl-O-alkylamines. C'est le cas du composé utilisé comme antagoniste allostérique du CaSR dans ce travail : **le NPS-2143**<sup>170</sup>. Ils ont été initialement développés dans le cadre de la prise en charge de l'ostéoporose. En effet, leur action biologique est responsable d'une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de PTH qui en s'établissant de façon pulsatile aurait dû mimer les effets anaboliques exercés par le tériparatide (PTH humaine 1-34) au niveau osseux. Cependant, les études cliniques réalisées avec des composés calcilytiques n'ont pas atteint les objectifs escomptés et l'utilisation de ce type de composés pharmaceutiques dans l'ostéoporose semble compromise. Ainsi, l'utilisation de calcilytiques dans les pathologies associées à une dérégulation du métabolisme phosphocalcique ne semble être pertinente que dans la prise en charge de l'hypocalcémie autosomique dominante<sup>175</sup>.

## 5 - Rôle du CaSR dans les calcifications vasculaires

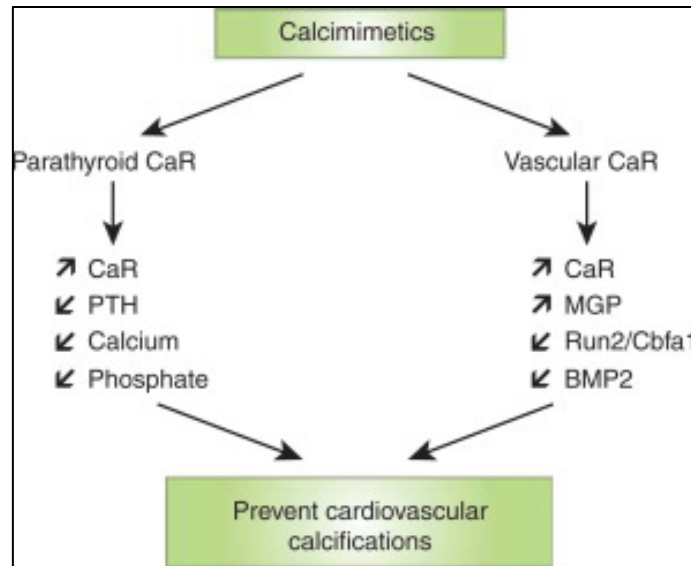
Plusieurs études ont démontré l'expression du CaSR au niveau vasculaire et suggéré l'action directe du CaSR sur la formation des CV<sup>176-179</sup>. Ainsi, une réduction de l'expression du CaSR a été observée dans les artères de patients atteints d'athérosclérose<sup>179</sup>. Des travaux *in vitro* sur des CMLV bovines ont montré qu'une surexpression d'une forme dominante négative du CaSR avait pour conséquence une augmentation de la formation de CV<sup>180</sup>. Dans cette étude, l'utilisation de NPS-R568 était capable d'augmenter la sensibilité du CaSR présent sur les CMLV et ainsi de réduire significativement le développement des CV. Au sein de notre laboratoire, des résultats similaires ont été obtenus en utilisant des CMLV humaines.

Confirmant le rôle protecteur joué par le CaSR au cours du processus de CV, l'ajout de NPS-R568 (100nM) à nos cultures cellulaires a limité le développement des calcifications induites par des concentrations pathologiques de phosphate inorganique<sup>181</sup>. Des résultats similaires ont alors été obtenus en diminuant l'expression du CaSR avec un siRNA. Les effets protecteurs exercés par le NPS-R568 sont alors abolis.

Ensemble, ces résultats suggèrent que l'expression et l'activation du CaSR protègent de la formation des calcifications. L'activation du récepteur par les calcimimétiques pourrait également stimuler l'expression des inhibiteurs de la minéralisation comme la MGP<sup>1,180,182,183</sup>.

Ces résultats ont été validés *in vivo*. En effet, les CV induites par néphrectomie associée à un régime enrichi en adénine dans un modèle de rat sont réduites lors de l'administration de calcimimétique (NPS-R568, 20mg/kg) chez ces animaux<sup>184</sup>. Cet effet est associé à une augmentation de l'expression du CaSR, de la MGP et de l'OPN ainsi qu'une diminution de BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein*) et de Pit1 au niveau vasculaire. Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris apoE<sup>-/-</sup> (déficiente en apolipoprotéine E) rendues insuffisantes rénales et traitées avec le NPS-R568. Dans ce modèle, le traitement des souris par calcimimétique (NPS-R568, 10mg/kg) avait à la fois conduit à une réduction significative des CV et de l'athérosclérose présentée par ces animaux<sup>181</sup>.

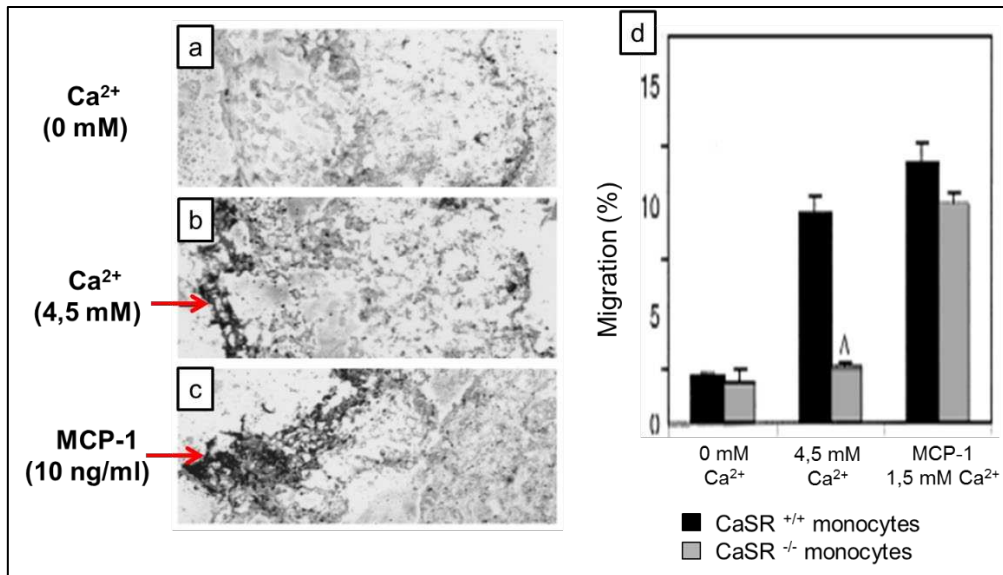
Il n'a pas été possible d'identifier le mécanisme d'action des calcimimétiques dans ces modèles. En effet, ceux-ci peuvent exercer une action à la fois systémique en contrôlant la concentration en PTH et l'augmentation du produit phosphocalcique observées chez ces animaux<sup>185</sup>, et peuvent exercer également une action locale comme celle décrite *in vitro* (**Figure 19**).



**Figure 19 : Les différents mécanismes d'action possibles des calcimimétiques sur les calcifications cardiovasculaires (Source : Torres et De Broe<sup>185</sup>).**

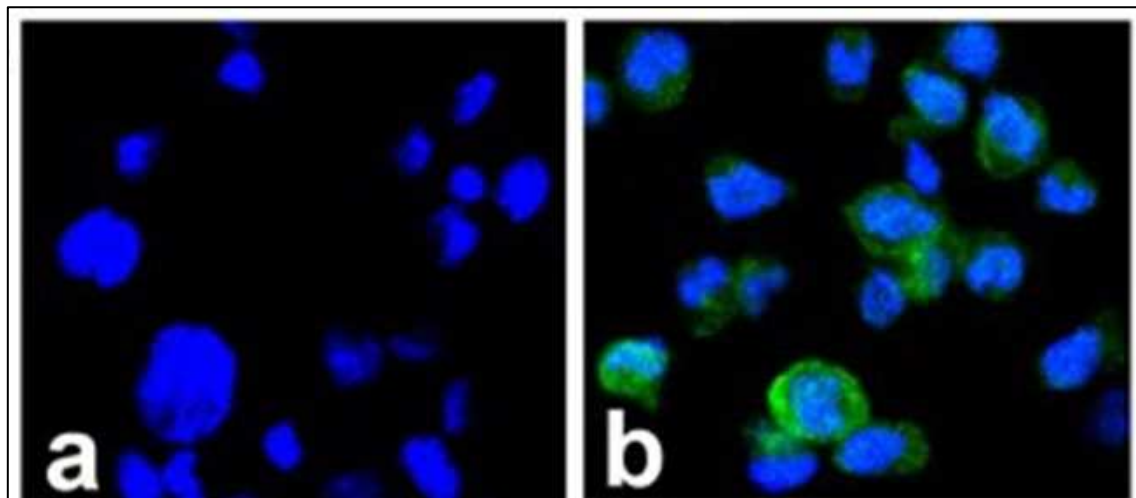
## 6 - CaSR et monocytes

Concernant le CaSR et les monocytes, notre équipe de recherche a mis en évidence que les monocytes circulants exprimaient le CaSR. Nos données indiquent que parmi les cellules mononucléées circulantes, les monocytes sont les seules à exprimer le CaSR sur leur membrane plasmique<sup>2</sup>. Cette expression permet aux monocytes de répondre de manière biologiquement adaptée aux variations de calcium extracellulaire auxquelles ils sont confrontés<sup>186,187</sup>. Une augmentation de la concentration en calcium extracellulaire peut ainsi exercer un effet chimioattractant sur les monocytes et moduler leur prolifération<sup>188</sup>. Comme on peut le voir dans cette étude publiée par *Olszak et al.*, lorsque du calcium est introduit en sous cutané on constate une chimioattraction des monocytes/macrophages exercée par le calcium<sup>4</sup> (**Figure 20-a,b,c**). Les monocytes isolés de souris déficientes en CaSR (CaSR  $-/-$ ) sont incapables d'en faire de même ce qui démontre un rôle essentiel du CaSR dans les capacités migratoires des monocytes/macrophages en réponse au calcium (**Figure 20-d**).



**Figure 20 : Résultats d'une étude démontrant la chimioattraction exercée par le calcium sur les monocytes.** a, b, et c : coupes de peaux de souris obtenues après injection de PBS (a), de 4,5mM de Ca<sup>2+</sup> (b) ou de MCP-1 (c). On peut observer que la présence de Ca<sup>2+</sup> ou de MCP-1 a provoqué une infiltration dense de monocytes (indiqués par les flèches). Le graphique (d) montre le chimiotactisme des PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) exprimant ou non le CaSR en réponse à des concentrations croissantes de Ca<sup>2+</sup> ou de MCP-1. On remarque que les PBMC n'exprimant pas le CaSR (-/-) ne sont pas attirés par le Ca<sup>2+</sup> contrairement aux monocytes qui l'expriment (CaSR +/+).

Les cellules de la lignée HL-60<sup>189</sup>, ainsi que les monocytes humains de type THP-1<sup>190</sup> expriment eux aussi le CaSR (Figure 21).



**Figure 21 : Expression du CaSR par les monocytes de la lignée THP-1 (Source : Xi et al.<sup>190</sup>).** Mise en évidence de l'expression du CaSR par immunofluorescence. Le noyau a été marqué au DAPI, l'absorption d'un peptide a servi de contrôle (a), le CaSR est principalement localisé à la membrane et dans le cytoplasme des THP-1 (b).

## **Objectifs de travail**

Au cours de notre travail nous nous sommes intéressés au rôle des monocytes dans la prise en charge des CV et à l'implication du CaSR dans ce phénomène. Longtemps considérée comme un processus passif, la CV est aujourd'hui reconnue comme un processus actif de dépôt de cristaux d'hydroxyapatite présentant de nombreuses similarités avec le processus de formation osseuse. Ce processus met en jeu les CMLV qui vont se différencier en cellules de phénotype ostéoblastique capables de synthétiser, dans les parois artérielles, une matrice osseuse minéralisée proche de celle observée au niveau osseux et appelée CV. A la différence de ce qui est observé au sein du tissu osseux, aucune cellule ne semble aujourd'hui capable de limiter le développement ou de résorber la CV lorsqu'elle est déjà présente.

L'hypothèse formulée par notre équipe serait que l'augmentation de l'expression du CaSR, par sa stimulation par le calcium (sous forme complexée ou non) et/ou par un calcimimétique, protégerait les patients du développement et de la progression des CV.

Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes attachés à préciser:

- 1- le rôle du monocyte dans la décalcification vasculaire
- 2- le rôle du CaSR dans ces phénomènes

La mise en place de nouveaux modèles d'études a été réalisée afin de répondre de façon adéquate aux questions que nous nous posions. Des cultures de segments carotidiens de rats ont servi de modèle de CV. Les CV ont été mises en évidence par coloration au rouge d'Alizarine ou par incorporation d'un agent fluorescent spécifique des microcalcifications. Ces colorations histologiques nous ont permis de valider nos conditions pro-calcifiantes.

Des monocytes humains ont été co-cultivés soit (1) pendant les 5 jours nécessaires à la mise en place des CV - modèle que l'on appellera « Préventif » dans le reste de la thèse - ou (2) durant 5 jours consécutifs après les 5 jours de culture nécessaires au développement des calcifications - modèle dit « Curatif ». Les segments carotidiens de rats ont ainsi été cultivés en présence de concentrations croissantes de monocytes. Le dépôt de calcium dans les segments carotidiens a été évalué en fin d'expérience (J5 dans le modèle « Préventif », J10 dans le modèle « Curatif ») par complexation avec de l'ortho-crésol-phtaléin.

## **Matériels et Méthodes**

## **1 - Cellules, lignées et milieux de culture**

Les cellules des lignées U937 et THP-1 ont été cultivées en suspension dans du milieu complet RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute : Sigma-Aldrich, réf : R0883) supplémenté avec 10% de SVF (Sérum de Veau Foetal : Dominique Dutscher, réf : 1901-P283010), 1% de GlutaMAX (Invitrogen) et 1% de Pénicilline/Streptomycine (Sigma-Aldrich, réf : P4333) dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été remises en suspension et diluées (au 1/10ème pour U937, au 1/3 pour les THP-1) 3 fois par semaine dans du milieu complet frais lors de leur phase d'expansion. La viabilité et la numération cellulaire ont été évaluées sur cellule de Malassez, par exclusion au bleu Trypan (0,4%) (Sigma-Aldrich, réf : T8154) : les cellules nécrotiques ou apoptotiques sont colorées en bleu alors que les cellules vivantes excluent le colorant.

L'isolement des PBMC a été réalisé sur une poche de sang de 500mL provenant d'un patient sain et volontaire. Les cellules mononuclées ont été isolées par gradient de densité. Tout d'abord, 20 ml de sang ont été mélangés avec 20 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline : Sigma-Aldrich, réf : D8537). Le sang dilué du patient a délicatement été déposé sur 10 ml d'Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, réf : 10771), afin de ne pas mélanger les deux liquides. Après une centrifugation de 20 minutes à température ambiante à 580 G, l'anneau blanc contenant les cellules mononuclées a été prélevé avec une pipette de transfert. Les cellules ont alors été rincées plusieurs fois puis comptées par exclusion au bleu Trypan sur cellule de Malassez.

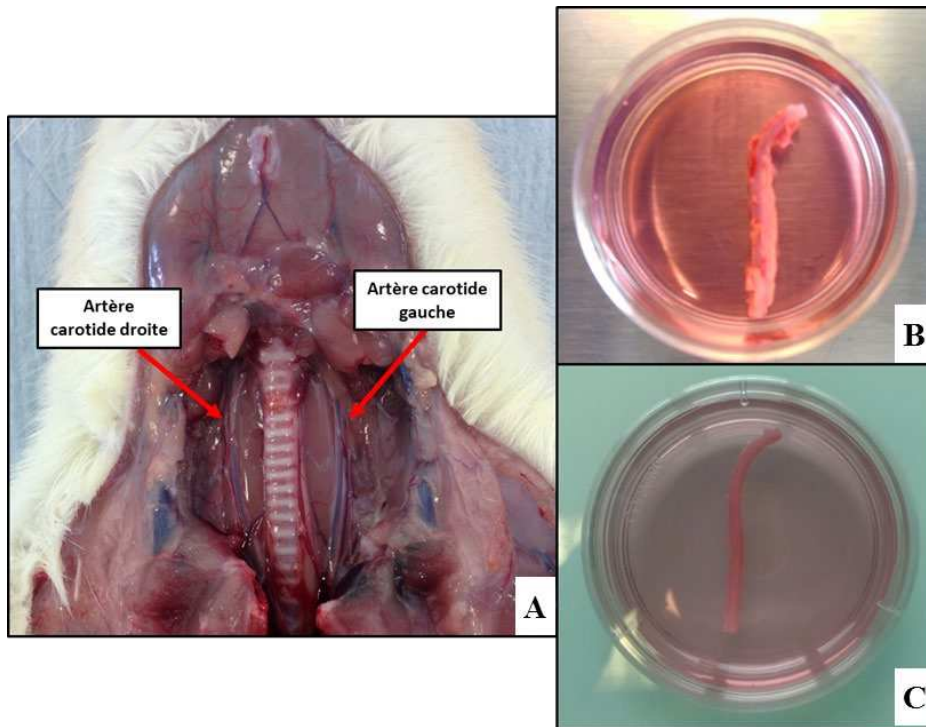
## **2 - Animaux et prélèvement des segments carotidiens**

Tous les animaux ont été manipulés conformément à la législation française (Directive 2010/63/UE du Parlement européen). Ils ont été logés dans des cages en polycarbonate dans des pièces à température et humidité contrôlées avec un cycle lumière / obscurité de 12h et ont un accès libre à l'eau et à la nourriture standard de laboratoire (Harlan, Oxon, UK).

Les prélèvements ont été effectués chez des rats mâles de la souche Wistar (Janvier Labs, réf : RN-WI-M), d'un âge entre 7 et 10 semaines et d'un poids d'environ 250g. Après injection d'une dose létale d'anesthésique (Pentobarbital, Exagon®, 1mL/0,5kg), les carotides sont



prélevées (**Figure 22A**). Les artères sont placées dans 3mL de milieu complet DMEM stérile (Dulbecco's Modified Eagle's Medium : Sigma-Aldrich, réf : D6546) (**Figure 22B**). La carotide est nettoyée et l'adventice est éliminée (**Figure 22C**). La carotide est ensuite coupée en segments de 5 mm à l'aide de ciseaux stériles. Chaque segment est placé dans 1mL de milieu complet DMEM puis placé à l'incubateur à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>.



**Figure 22 : Les différentes étapes du prélèvement d'une carotide de rat.** A. Photographie de la dissection d'un rat Wistar montrant les deux artères carotides (droite et gauche), B. Artère carotide dans une boîte de Petri juste après extraction, C. Artère carotide nettoyée et débarrassée de l'adventice.

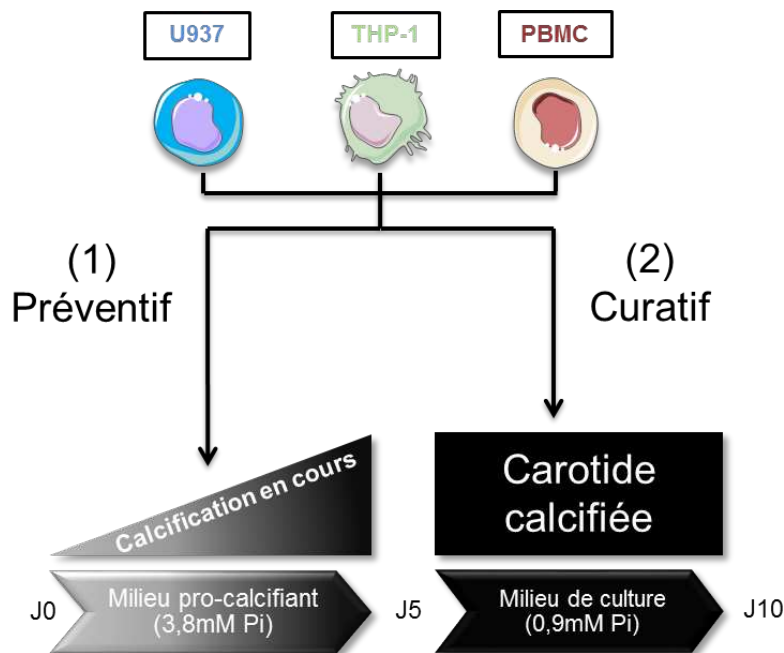
### **3 - Modèle de calcification**

Les segments carotidiens ont été incubés dans 1mL de milieu complet DMEM supplémenté en phosphate inorganique (Sigma-Aldrich, réf : S5011) à 3,8mM à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu est renouvelé de moitié 3 jours après la mise en culture, la culture des segments s'étend sur 5 jours.

A partir de ce modèle nous avons mis en place un modèle « Préventif » où les monocytes sont introduits pendant la phase de développement des calcifications (J1 à J5) et un modèle « Curatif » où les monocytes sont introduits après les 5 jours de mise en place des calcifications (J5 à J10).

### 3-1 Modèle Préventif

Pour chaque expérience, les segments ont été extraits puis incubés dans 1mL de milieu complet DMEM en présence de 3,8mM de phosphate inorganique. Les monocytes (U937, THP-1) ou les PBMC ont été introduits en culture à des concentrations allant de  $50.10^3$  à  $250.10^3$ /mL (**Figure 23**). Le milieu a été renouvelé pour moitié à J3 sans ajout de nouveaux monocytes. La culture est arrêtée à J5. Les segments sont ensuite prélevés et un dosage de calcium est réalisé. Des carotides non calcifiées ont également été utilisées dans ce travail. Ces carotides étaient quant à elles cultivées dans des conditions similaires à celles que nous venons de décrire mais sans que le milieu de culture ne soit enrichi en phosphate inorganique. La concentration en phosphate dans le milieu de culture était alors de 0,9 mM.



**Figure 23 : Schéma des deux modèles d'études : Préventif et Curatif.** (1) Modèle « Préventif », les monocytes sont introduits lors de la calcification de la carotide de J0 à J5. (2) Modèle « Curatif », les monocytes sont introduits à J5, lorsque la carotide est déjà calcifiée.

## 3-2 Modèle Curatif

Dans ce second modèle (**Figure 23**), les segments ont été mis en culture pendant 5 jours nécessaires au développement de la calcification dans un milieu DMEM contenant 3,8mM de phosphate inorganique ou contrôle (0,9mM de phosphate inorganique). Après les 5 jours (à J5) de calcification les segments ont été placés dans 1mL de milieu complet DMEM contenant différentes concentrations de monocytes (de  $50.10^3$  à  $250.10^3$ /mL). Le milieu a été renouvelé de moitié à J8 sans ajout de nouveaux monocytes. La culture est arrêtée à J10, les segments sont ensuite récupérés et un dosage de calcium présent au sein de ce tissu est réalisé.

## 4 - Mise en évidence des calcifications

Le dosage du calcium contenu dans les segments carotidiens a été effectué par complexation avec de l'ortho-crésol-phtaléin. Certains segments carotidiens ont été inclus dans des blocs d'OCT (Sakura Tissue-Tek®, réf : 4583) et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Des coupes histologiques ont ensuite été réalisées sur ces blocs et la mise en évidence des calcifications est ensuite effectuée soit par coloration au rouge d'Alizarine, soit par analyse en fluorescence en microscopie confocale.

### 4-1 Dosage de calcium par ortho-crésol-phtaléin

En fin d'expérience, chaque segment carotidien est décalcifié pendant une nuit dans une solution de HCl (Sigma-Aldrich, réf : 258148) 0,6N. La solution de HCl est ensuite utilisée pour effectuer un dosage à l'ortho-crésol-phtaléin [solution contenant 5,73mg d'ortho-crésolphtaléin complexone (Sigma-Aldrich, réf : P5631), 69,6mg de 8-hydroxyquinoline (Sigma-Aldrich, réf : 252565) et 30mL d'AMP (Sigma-Aldrich, réf : A9199) 0,5M (pH 10,5)]. Un dosage colorimétrique a ensuite été réalisé à 570nm avec un spectrophotomètre de type EnVision® (Siemens). Les segments carotidiens sont soumis à dessiccation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit, puis pesés. Les résultats sont standardisés par rapport à la masse sèche du segment carotidien.

## 4-2 Coloration au rouge d'Alizarine

Les coupes carotidiennes sont incubées durant 2 minutes dans une solution d'Alizarin red S 40mmol/L, à un pH de 4,2 et à température ambiante. Les coupes sont alors rincées successivement dans un bain d'acétone 100% (1 minute), dans une solution d'acétone-toluène 1:1 (1 minute) puis dans un bain de toluène 100% (5 minutes). Une fois les lames sèches, elles sont montées avec du DPX (Sigma Aldrich, réf : 06522). Le dépôt minéral, coloré en rouge, est photographié au microscope via le logiciel Histolab®.

## 4-3 Marquage à l'agent fluorescent OsteoSense® 680 EX

L'OsteoSense® 680 EX (Perkin Elmer, réf : NEV10020EX) est un agent fluorescent de nature chimique proche de celle des bisphosphonates. Ainsi, l'OsteoSense® 680 EX a un tropisme important pour les matrices tissulaires minéralisées. Sa fixation quasiment irréversible sur ces dernières rend possible la visualisation en imagerie par fluorescence des zones de microcalcification. Avant l'inclusion dans l'OCT, lors de la calcification d'un segment carotidien, l'OsteoSense® 680 EX (2nM) a été déposé dans le milieu de culture à J4, soit 24h avant la fin de l'expérience. Les coupes ont été fixées par une solution de PFA 4% (10 minutes), puis ont été incubées dans une solution de PBS/Glycine (10 minutes). Après 3 rinçages au PBS (10 minutes) les coupes ont été incubées avec une solution Hoechst 8% (5 minutes) puis rincées de nouveau 3 fois aux PBS (10 minutes) et enfin montées avec du Mowiol. Les zones de calcifications fluorescent en rouge et ont été photographiées par microscopie confocale (Zeiss® LSM780) à la plateforme d'Ingénierie Cellulaire et Analyses des Protéines (ICAP) d'Amiens.

## 5 - Localisation des monocytes dans les segments carotidiens

Afin de localiser les monocytes à l'intérieur des segments carotidiens, nous avons marqué les monocytes à l'aide d'un agent fluorescent, le PKH26 (Sigma-Aldrich, réf : PKH26GL). Il s'agit d'une molécule qui se fixe au sein de la bicouche phospholipidique des cellules. Les monocytes marqués au PKH26 ont été mis en présence des segments carotidiens puis les segments

carotidiens ont été inclus en OCT afin de réaliser des coupes histologiques. Nous avons choisi ce colorant vital pour nos expériences car il permet d'observer et de localiser les monocytes présents dans les coupes de tissu cinq jours après que ces derniers n'aient été mis en culture avec les segments carotidiens. Comme précédemment, l'observation et l'acquisition des images est réalisée en microscopie confocale.

## **6 - Analyse par cytométrie en flux**

- Expression du CaSR

Afin de déterminer le taux d'expression du CaSR membranaire et total des monocytes, nous avons utilisé une technique de dosage quantitative du CaSR par cytométrie de flux mise au point au laboratoire. Les monocytes ont été lavés avec 0,5 ml de PBS-0,5% BSA. Après une centrifugation à 400 G pendant 5 minutes, les cellules ont été resuspendues avec 1mL de PBS-0,5%BSA puis divisées en 2 tubes : le premier destiné au dosage du CaSR membranaire et le deuxième destiné au dosage du CaSR total.

- Perméabilisation des cellules

Afin de mesurer le taux d'expression du CaSR total, la détection des CaSR présents au niveau intracellulaire doit être réalisée en plus du marquage membranaire. Ceci requiert la réalisation d'une perméabilisation cellulaire avant de réaliser l'immunomarquage. Cette perméabilisation a été effectuée à l'aide du kit BD Cytotfix/Cytoperm. Après centrifugation, les cellules ont été perméabilisées dans 100µL de solution perméabilisante pendant 10 min. Cette étape est réalisée sur un lit de glace afin de maintenir les cellules dans un environnement réfrigéré (environ 4°C).

- Immunomarquage du CaSR

Après un lavage dans 0,5mL de PBS-0,5%BSA, les cellules ont été centrifugées puis incubées pendant 30 minutes dans la glace en présence de l'anticorps primaire anti-CaSR de souris ou de l'isotype correspondant anti-IgG2a murin, dilués au 1/40<sup>ème</sup> dans une solution de PBS-0,5%BSA. Les cellules ont ensuite été lavées avec 500µL de PBS-0,5%BSA et centrifugées à 400 G pendant 5 minutes puis incubées pendant 45 minutes à l'obscurité dans la glace en présence de l'anticorps secondaire anti-souris conjugué au PE (Phycoerythrin) dilué au 1/50<sup>ème</sup>.

Les analyses ont été réalisées grâce au cytomètre en flux BDFACS Canto II (BD Biosciences). Les anticorps primaires et secondaire sont listés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 4**).

**Tableau 4 : Références, caractéristiques et dilutions des anticorps primaires et secondaires utilisés pour la cytométrie de flux.**

Anticorps	Référence	Caractéristique	Dilution
Primaires	NB120-19347 (Novus Biotechne)	Anticorps monoclonal produit chez la souris, dirigé contre le CaSR humain	1/40
	X0943 (Dako)	IgG2a produit chez la souris	1/40
Secondaire	R0480 (Dako)	Anticorps polyclonal couplé à une phycoerythrine, produit chez la chèvre, dirigé contre la souris	1/50

## **7 - Transwell®**

Les segments carotidiens ont été séparés des monocytes U937 par un Transwell® (Corning, 24-well plate, 0.4µm-pore). Chaque Transwell® se compose d'un insert (Upper Chamber) tapissé d'une membrane poreuse, ici les pores ont un diamètre de 0.4µm, ne permettant pas de laisser passer les monocytes et d'un puits (Lower Chamber) qui permet d'accueillir l'insert. Chaque puits comprenait le segment carotidien dans 600µL de milieu complet DMEM et chaque insert comprenait 100µL de monocytes U937 dans le même milieu. Les cellules ont été lavées 3 fois au PBS stérile puis re-suspendues dans du milieu complet DMEM. Elles ont ensuite été introduites dans les inserts des Transwell®, à raison de  $100 \cdot 10^3$  cellules par Transwell®. Après 5 jours de culture à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>, les segments carotidiens ont été prélevés et un dosage de calcium a été réalisé (cf. **Dosage de calcium par ortho-crésol-phtaléin**).

## **8 - Surnageants de culture**

A la suite d'une expérience du modèle « Préventif », les milieux de culture des différentes conditions ont été récupérés à J5. Ces milieux ont été centrifugés à 400 G pendant 5 minutes afin de séparer le milieu de culture des cellules qu'il contient. Ces surnageants de culture ont ensuite été utilisés afin d'être incubés avec différents segments calcifiés ou non durant 5 jours à 37°C. Un dosage du contenu en calcium présent au sein de ces segments est ensuite réalisé par technique de complexation au ortho-crésol-phtaléin.

## **9 - Préincubation des cellules au calcimimétique/calciolytique**

Lorsque nécessaire, les monocytes ont été lavés avec un milieu non complet RPMI-1640 et centrifugés à 400 G pendant 5 minutes. Les monocytes ont ensuite été incubés dans un milieu non complet RPMI-1640 supplémenté en calcimimétique NPS R-568 (100nM) ou calciolytique NPS-2143 (IC<sub>50</sub>= 41nM) pendant 30 minutes à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. Ensuite, les cellules ont été lavées au PBS stérile et centrifugées à 400 G pendant 5 minutes, puis re-suspendues et incubées avec un segment carotidien pendant 5 jours.

## **10 - Analyse statistique**

Les expériences indépendantes ont toutes été réalisées en double. Nos résultats sont exprimés en moyennes ± SEM. Les différences statistiques entre les groupes ont d'abord été évaluées à l'aide d'un test non paramétrique Kruskal-Wallis. Lorsque le test Kruskal-Wallis indiquait une différence significative ( $p < 0,05$ ), un post-test non paramétrique Mann Whitney a été réalisé pour déterminer les différences statistiques entre deux groupes. Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 8. Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative.

## **Résultats/Article**



Les résultats de notre travail ont été associés à l'étude du Dr Aurélien Mary et présentés sous la forme d'un article intitulé « Association of decreased monocyte CaSR expression in chronic kidney disease patients with impaired monocyte ability to reduce vascular calcification. » soumis dans *Kidney International*.

Les travaux du Dr Aurélien Mary ont permis de mesurer l'expression (totale et membranaire) du CaSR des PBMC isolés chez des patients atteints d'IRC à divers stades. Cette étude a permis de constater que l'IRC était associée à une diminution de l'expression du CaSR des PBMC à la fois au niveau total et membranaire (respectivement 43% et 34%, aux stades 4-5 de l'IRC).

En complément de ces résultats, grâce à nos modèles de calcification (« Préventif » et « Curatif ») *in vitro* nous avons démontré que les monocytes de lignées cellulaires (U937 ou THP-1) ou PBMC étaient capables de réduire les calcifications. L'utilisation d'agents fluorescents (OsteoSense® 680 EX et PKH-26) a permis de démontrer, en microscopie confocale, la présence de cristaux à l'intérieur des monocytes utilisés dans nos modèles de calcification. En outre, la pré-incubation des monocytes avec le calcilytique NPS-2143 inhibe significativement la capacité de ces derniers à prendre en charge les CV *in vitro* aussi bien dans le modèle « Préventif » que « Curatif ». La diminution du CaSR est donc également associée à une diminution de la capacité des monocytes et PBMC à inhiber la CV. L'utilisation du calcimimétique NPS-R568 a permis d'observer une amélioration de la prise en charge des calcifications. La pré-incubation des PBMC isolés de patients présentant une IRC avec le NPS-R568 a également amélioré de manière significative la capacité de ces cellules à réduire les calcifications.

L'ensemble de nos travaux démontre une diminution de l'expression du CaSR des PBMC chez les patients atteints d'IRC. Cette diminution pourrait jouer un rôle dans la capacité des monocytes à réduire les CV associées à l'IRC. Il est nécessaire de rappeler que les CV sont courantes dans l'IRC et augmentent la mortalité cardiovasculaire, cependant il n'y a pas de traitement spécifique à ce jour. Dans ce contexte, compenser la diminution de l'expression du CaSR des monocytes notamment avec des composés calcimimétiques pourrait s'avérer être une nouvelle stratégie thérapeutique visant à protéger les patients atteints d'IRC contre la CV. Avant cela, des données complémentaires devront être recueillies.

**Article: Association of decreased  
monocyte CaSR expression in  
chronic kidney disease patients with  
impaired monocyte  
ability to reduce vascular calcification.**

Article soumis le 18 Mai 2020 dans *Kidney International* (KI).

Manuscript Number : KI-05-20-0905



**Association of decreased monocyte CaSR expression in chronic kidney disease patients with impaired monocyte ability to reduce vascular calcification.**

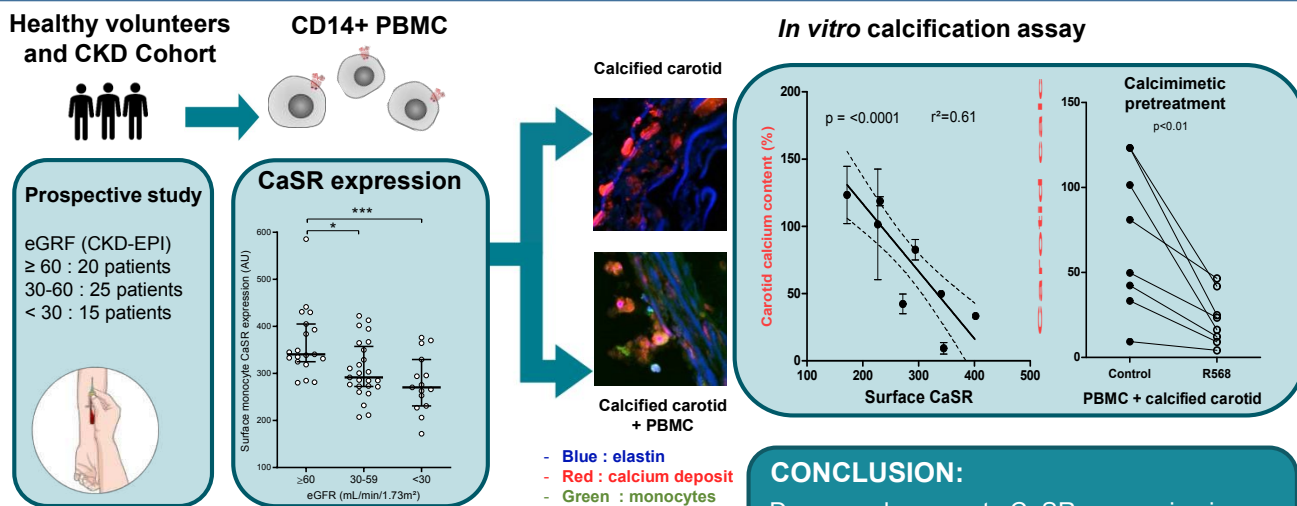
Journal:	<i>Kidney International</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Basic Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Mary, Aurelien; UR 7517 UPJV, Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications (MP3CV). Picardie Jules Verne University; University Hospital Centre Amiens-Picardie, Clinical pharmacy</p> <p>Objois, Thibaut; UR 7517 UPJV, Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications (MP3CV). Picardie Jules Verne University</p> <p>Brazier, Michel; UR 7517 UPJV, Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications (MP3CV). Picardie Jules Verne University; University Hospital Centre Amiens-Picardie, Amiens University Hospital</p> <p>Bennis, Youssef; UR 7517 UPJV, Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications (MP3CV). Picardie Jules Verne University; University Hospital Centre Amiens-Picardie, Human Biology Centre</p> <p>Boudot, Cédric; UR 7517 UPJV, Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications (MP3CV). Picardie Jules Verne University</p> <p>Lenglet, Gaëlle; UR 7517 UPJV, Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications (MP3CV). Picardie Jules Verne University</p> <p>Paccou, Julien; University Lille 2, PMOI, Pathophysiology of inflammatory bone diseases, EA 4490; Regional and University Hospital Centre Lille, Rheumatology</p> <p>Bugnicourt, Jean-Marc; UR 7517 UPJV, Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications (MP3CV). Picardie Jules Verne University</p> <p>Choukroun, Gabriel; University Hospital Centre Amiens-Picardie, Division of Nephrology; UR 7517 UPJV, Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications (MP3CV). Picardie Jules Verne University,</p> <p>Drueke, Tilman; INSERM UMRS 1018, Research Centre in Epidemiology and Population Health (CESP), Team 5</p> <p>Massy, Ziad; INSERM UMRS 1018, Research Centre in Epidemiology and Population Health (CESP), Team 5; Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, ; CHU Ambroise Paré, Nephrology</p> <p>Kamel, Saïd; UR 7517 UPJV, Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications (MP3CV). Picardie Jules</p>

	Verne University; University Hospital Centre Amiens-Picardie, Human Biology Centre Six, Isabelle; UR 7517 UPJV, Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications (MP3CV). Picardie Jules Verne University Mentaverri, Romuald; UR 7517 UPJV, Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications (MP3CV). Picardie Jules Verne University, 80025 Amiens; University Hospital Centre Amiens-Picardie, Human Biology Centre
Keywords:	chronic kidney disease, vascular calcification, inflammation, calcium, macrophages
Subject Area:	Mineral and Bone Disorders, Chronic Kidney Injury, Immunology

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Graphical Abstract

Association of decreased monocyte CaSR expression in chronic kidney disease patients with impaired monocyte ability to reduce vascular calcification.



Objois T, Mary A, et al. 2020

OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF NEPHROLOGY

view Only

**Title page**

(a) complete manuscript title :

**Association of decreased monocyte CaSR expression in chronic kidney disease patients with impaired monocyte ability to reduce vascular calcification.**

**Running Headline:** Decreased monocyte CaSR and vascular calcification in CKD

(b) authors' full names

authors' full names

Thibaut Objois<sup>1\*</sup>, Aurélien Mary (PharmD, PhD)<sup>1,2\*</sup>, Michel Brazier (MD, PharmD, PhD)<sup>1,3</sup>,  
Bennis Y (PharmD, PhD)<sup>1,3</sup>, Cédric Boudot (PhD)<sup>1</sup>, Gaëlle Lenglet (PhD)<sup>1</sup>, Julien Paccou  
(MD, PhD)<sup>4,5</sup>, Jean-Marc Bugnicourt (MD, PhD)<sup>1</sup>, Gabriel Choukroun (MD, PhD)<sup>1,6</sup>, Tilman  
B Drueke (MD, PhD)<sup>7</sup>, Ziad A Massy (MD, PhD)<sup>7,8,9</sup>, Saïd Kamel (Pharm, PhD)<sup>1,3</sup>, Isabelle  
Six (PharmD, PhD)<sup>1</sup>, Romuald Mentaverri R (PharmD, PhD)<sup>1,3</sup>

1. UR 7517 UPJV, Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications (MP3CV). Picardie Jules Verne University, 80025 Amiens, France

2. Amiens University Hospital, Clinical pharmacy department, 80054 Amiens, France

3. Amiens University Hospital, Human Biology Centre, 80054 Amiens, France

4. Lille 2 University, PMOI, Pathophysiology of inflammatory bone diseases, EA 4490, 59000 Lille, France

1  
2  
3 5. Lille University Hospital, Rheumatology, 59000 Lille, France  
4  
5

6 6. Amiens University Hospital, Nephrology, 80054 Amiens, France  
7  
8

9  
10 7. INSERM U-1018, Research Centre in Epidemiology and Population Health (CESP), Team  
11  
12 5, 94807 Villejuif, France  
13  
14

15  
16 8. Ambroise Paré Hospital, Nephrology, 92104 Boulogne-Billancourt, France  
17  
18

19 9. Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines University, Paris-Ile-de-France-Ouest, 78000  
20  
21 Versailles, France  
22  
23

24  
25 \* The two authors contributed equally  
26  
27  
28  
29  
30  
31

32 **(c) Corresponding author:**

33 Dr Aurélien Mary

34 UR7517. Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS) Amiens, France. 80 000  
35  
36 AMIENS.

37  
38 Phone : 03 22 82 54 25

39 Fax : 03 22 82 54 16

40 e-mail : aurelien.mary@u-picardie.fr  
41  
42  
43  
44  
45  
46

47 **(d) sources of support that require acknowledgment**  
48  
49

50 All of the work was funded by the institutions on which the authors depend.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Abstract

In chronic kidney disease (CKD), the expression and function of the calcium-sensing receptor (CaSR) has been extensively studied in parathyroid tissue. However, little is known about its expression and function in other tissues and cell types in CKD. To examine the question whether similar changes occurred elsewhere, we measured total and surface CaSR expression in monocytes of patients with various stages of CKD and healthy volunteers respectively in cross-sectional studies. We further explored the impact of uremic serum on CaSR expression in monocytes (U937 and THP-1 cell lines) *in vitro*, and whether human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or U937 and THP-1 monocytes might modify carotid calcium content in an *in vitro* calcification assay. We found that CKD was associated with a decrease in PBMC CaSR expression both in whole monocytes and at monocyte surface alone (43% and 34%, respectively in CKD stages 4-5). This decrease was associated with a reduction in monocytes' capacity to inhibit vascular calcification *in vitro*. Pretreatment with calcimimetic NPS-R568 of PBMCs isolated from CKD patients significantly improved the monocytes' capacity to reduce carotid artery calcification *in vitro*, more markedly in monocytes with lower than higher CaSR expression. Thus, we demonstrate that monocyte CaSR expression is decreased in patients with CKD, and provide *in vitro* evidence for a potential role of this decrease in the promotion of arterial calcification. Targeting this alteration might therefore represent a promising therapeutic strategy in CKD-associated arterial calcification.

## Key words

Calcium sensing receptor, monocytes, chronic kidney disease, vascular calcification, translational medical research



### Translational Statement

Vascular calcifications are common in CKD and increases cardiovascular mortality. However, there is no specific treatment to date. Our results show a decrease of monocyte calcium-sensing receptor (CaSR) expression in CKD, associated with a disturbance of monocytes' capacity to reduce vascular calcification. Specifically targeting reduced monocyte CaSR expression with different drugs such as calcimimetics or other CaSR activators may represent an interesting novel therapeutic objective, aiming to protect patients with CKD against vascular calcification. This goal deserves further clinical investigation.

## Introduction

The calcium sensing receptor (CaSR) – a class C G-Protein Coupled Receptor – is mainly expressed in the kidney and the parathyroid<sup>1</sup>. Due to its ability to sense variations of extracellular calcium concentration, CaSR plays a major role in regulating parathyroid hormone secretion and calcium homeostasis.

In chronic kidney disease (CKD) CaSR expression is decreased in parathyroid gland<sup>2</sup> and contributes to secondary and tertiary hyperparathyroidism<sup>3</sup>. A CKD-associated decrease of CaSR expression has also been observed in other tissues including the vasculature<sup>4</sup>, heart valves<sup>5</sup>, and kidney<sup>6,7</sup>. The lower expression of CaSR in the vasculature is implicated in the pathogenesis of arterial calcification<sup>8</sup> while the decrease of renal CaSR modifies renal cations handling<sup>8</sup>. Monocytes are the rare circulating cells with high CaSR expression<sup>9</sup>. Although the role of monocyte CaSR has not been fully elucidated, several studies demonstrated that it plays a critical role in monocyte migration<sup>10</sup> and cytokine production such as IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ <sup>11,12</sup>, promoting and mediating the inflammatory response in tissue injury<sup>13</sup>. In CKD, an increase in monocyte number has been reported<sup>14</sup>, together with a higher rate of bacterial infections and impaired vaccine responses<sup>15</sup>. Due to the potential contribution of CaSR to inflammation and immune dysfunction and because information is lacking on monocyte CaSR expression in CKD, we asked whether monocyte CaSR expression was modulated in CKD. We therefore quantified total CaSR expression in CD14<sup>+</sup> peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from a cohort of healthy adults and patients with different stages of CKD, respectively. Moreover, we tested the *in vitro* effect of uremic serum on PBMC CaSR expression. We then investigated the role of monocytes CaSR expression in an *ex vivo* model of vascular calcification, as well as the consequences of CKD-induced CaSR variation in the same model.

## Results

### Main characteristics of the study population

The main clinical and biochemical characteristics of the study population are presented in Table 1. Estimated glomerular filtration rate (eGFR) values using CKD-EPI formula were equal or superior to 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup> in 20 subjects, and inferior in 40 subjects. As expected, the uremic toxin serum concentrations of paracresyl sulfate [PCS], indoxyl sulfate [IS], and indole acetic acid [IAA], as well as serum phosphate and iPTH levels were significantly increased in patients with CKD, whereas blood hemoglobin concentration and monocyte numbers were significantly decreased.

### Monocyte CaSR expression in patients with CKD and healthy subjects

Both total and surface monocyte CaSR expressions were significantly lower in subjects with eGFR < 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup> as compared to subjects with eGFR ≥ 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup>.

Specifically, total CaSR expression was significantly decreased by 35% in CKD stage 3 and by 43% in CKD stages 4-5 (Figure 1A), and surface CaSR expression by 25% in CKD stage 3 and by 34% in CKD stages 4-5 (Figure 1B).

In an attempt to identify the factors involved in the decrease of monocyte CaSR expression, we analyzed several clinical and biochemical parameters. In univariate logistic regression analysis, total monocyte CaSR expression below the median was significantly associated with eGFR (OR [95%CI] per 10 mL/min/1.73m<sup>2</sup> = 0.70 [0.55-0.89]; p=0.004), serum PCS (OR [95%CI] per 5 μg.mL<sup>-1</sup> = 1.42 [1.12-1.81]; p=0.004), serum IS (OR [95%CI] per 2 μg.mL<sup>-1</sup> = 1.54 [1.03-2.31]; p=0.034), and serum 25(OH) vitamin D<sub>3</sub> (OR [95%CI] per 10 ng.mL<sup>-1</sup> = 0.50 [0.30-0.82]; p=0.006). When these parameters were included in a multivariable model, only serum PCS and 25(OH) vitamin D<sub>3</sub> remained significantly associated with low CaSR

1  
2  
3 expression, with OR [95%CI] per 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  = 1.39 [1.01-1.93] ( $p=0.046$ ) and OR [95%CI]  
4  
5 per 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  = 0.54 [0.31-0.97] ( $p=0.039$ ), respectively (Figure 1C). In univariate logistic  
6  
7 regression, surface monocyte CaSR expression below the median was significantly associated  
8  
9 with eGFR (OR [95%CI] per 10  $\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$  = 0.63 [0.47-0.82];  $p=0.001$ ), blood  
10  
11 hemoglobin (OR [95%CI] per 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  = 0.66 [0.44-0.99];  $p=0.044$ ), and total monocyte CaSR  
12  
13 expression (OR [95%CI] per 100 UA = 0.84 [0.72-0.98];  $p=0.029$ ). When these variables  
14  
15 were included in multivariable logistic regression, low surface CaSR expression of monocyte  
16  
17 was associated only with eGFR with OR [95%CI] per 10  $\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$  = 0.61 [0.41-0.91];  
18  
19  $p=0.015$  (Figure 1D).

### 20 21 22 23 24 **Impact of uremic serum on monocyte CaSR expression *in vitro***

25  
26  
27 A possible association between monocyte CaSR expression and CKD was further explored *in*  
28  
29 *vitro* using pooled sera from healthy volunteers and CKD patients. As expected, serum  
30  
31 phosphate, creatinine, urea, uric acid, PCS, IS, IAA, and CRP concentrations were higher in  
32  
33 CKD patients than healthy controls (Figure 2A). A 48-hour incubation of PBMCs in  
34  
35 increasing amounts of uremic serum led to a dose-dependent, significant decrease in total cell  
36  
37 CaSR expression, whereas healthy serum failed to do so (Figure 2B). However, the same  
38  
39 incubation procedure did not affect PBMC surface CaSR expression, in particular because of  
40  
41 large deviations. (Figure 2C).

### 42 43 44 45 46 **Involvement of monocytes in vascular calcification *in vitro***

47  
48  
49 To explore potential pathophysiological consequences and considering the well-known  
50  
51 association of soft-tissue calcification with CKD<sup>16</sup> and reduced CaSR expression<sup>17</sup>, we  
52  
53 decided to examine a possible influence of monocyte CaSR in vascular mineralization. First  
54  
55 we wanted to know whether the addition of culture monocytes or PBMCs modified carotid  
56  
57 calcification induced by phosphate (3.8 mM). We exposed rat carotids to increasing monocyte  
58  
59  
60

1  
2  
3 numbers, ranging from  $50 \cdot 10^3$  to  $100 \cdot 10^3$  cells either during the mineralization process  
4  
5 (preventive model) or for 5 days after the pro-mineralizing culture phase (curative model). As  
6  
7 shown in supplemental Figure 1, carotid calcification increased to reach around 75  $\mu\text{g}$  of  
8  
9 calcium by mg of tissue after the first 5 days of culture. In the preventive model, carotid  
10  
11 calcium content was significantly reduced by  $58 \pm 7\%$ ,  $73 \pm 3\%$  and  $82 \pm 3\%$  (comparatively  
12  
13 to exposure to medium culture alone), when exposed to the presence of culture monocytes  
14  
15 (U937 or THP-1) or PBMCs, respectively (Figure 3). Similar results were obtained in the  
16  
17 curative model except for calcified carotids co-cultured with THP-1 cells. The mean carotid  
18  
19 calcium content remained unchanged (from day 5 [ $75.77 \mu\text{g}/\text{mg}$ ] to day 10 [ $74.58 \mu\text{g}/\text{mg}$ ]),  
20  
21 unless carotids were co-cultured with monocytes.  
22  
23  
24  
25

26  
27 Osteosense® 680 EX staining and confocal microscopy allowed us to demonstrate the  
28  
29 presence of calcium deposition in the carotids of our model (Figure 4A). Staining specificity  
30  
31 was demonstrated by the absence of red fluorescent signal in slices of carotids exposed to 0.9  
32  
33 mM of Pi during 5 days (control) and stained with Osteosense® 680 EX during the last 24 h  
34  
35 of culture (from day 4 to day 5).  
36  
37  
38

39 In the curative model, an additional U-937 membrane pre-staining with PKH26 showed that  
40  
41 the cells were adherent to the vascular wall (Figure 4B). The adhesion was associated with i)  
42  
43 an internalization of Osteosense® 680 EX staining into the PKH26 positive cells, and ii) a  
44  
45 decrease in calcium deposits in the carotid media. Interestingly, the presence of monocytes  
46  
47 was inefficient to reduce carotid mineralization when physically separated from carotid  
48  
49 segments ( $0.4 \mu\text{m}$  pore size Transwell) or when U937, THP-1 or PBMC culture supernatants  
50  
51 were introduced in culture instead of monocytes (Supplemental Figure 2).  
52  
53

54  
55 **Association of monocyte CaSR activity or expression with monocyte ability to reduce**  
56  
57 **calcification *in vitro***  
58  
59  
60

1  
2  
3 Implicating the CaSR in this phenomenon, pre-incubation of monocytes (30 min) with the  
4  
5 CaSR antagonist NPS 2143 [41 nM] significantly inhibited their ability to reduce vascular  
6  
7 calcification *in vitro* in both the "preventive" and "curative" models (Supplemental Figure 3).  
8  
9  
10 On the opposite, pretreatment of the cells for 30 min with the CaSR positive allosteric  
11  
12 modulator NPS-R568 improved the capacity of monocytes to protect against carotid  
13  
14 calcification (Supplemental Figure 4). Taken together, these results indicate that monocytes  
15  
16 may reduce vascular calcification *in vitro* and that the CaSR is involved in this process. To  
17  
18 evaluate whether monocyte CaSR expression levels influence their ability to decrease  
19  
20 vascular calcification *in vitro*, we co-cultured PBMCs from 8 CKD patients with calcified  
21  
22 carotids (curative model). As reported in Figure 5, there was an inverse relationship between  
23  
24 both total (Figure 5A) and surface (Figure 5B) CaSR expression on monocyte and the carotids  
25  
26 mineral content which reach a highly significant level ( $r^2 = 0.61$ ;  $p < 0.0001$ ) only with surface  
27  
28 CaSR expression. Of note pretreatment of the same PBMCs by a calcimimetic (NPS-R568)  
29  
30 significantly improves CKD monocyte capacities to reduce carotid calcification (Figure 5C),  
31  
32 but without suppressing the correlation between surface CaSR expression and calcium carotid  
33  
34 content (Supplemental Figure 5). The less PBMCs expressed cell surface CaSR, the more  
35  
36 NPS-R568 treatment enhanced the decrease of carotid calcium content, as compared to that of  
37  
38 non NPS-R568-treated cells (Figure 5D).  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

## 48 Discussion

49  
50  
51 Our results demonstrate for the first time that, as in parathyroid and vascular tissue<sup>8</sup>, the  
52  
53 uremic state induces a decrease of CaSR expression in blood monocytes of CKD patients.  
54  
55 Both total and surface CaSR expression progressively decreased with the degree of severity of  
56  
57 CKD, suggesting a potential pathophysiological role. Total monocyte CaSR expression was  
58  
59 also decreased after exposure to uremic serum *in vitro*, suggesting a role of one or more  
60

1  
2  
3 circulating compounds retained in CKD, in particular uremic toxins. This is consistent with  
4  
5 the independent association we found between total monocyte CaSR expression and serum  
6  
7 PCS concentration in CKD patients. However, the specific cellular mechanism whereby PCS  
8  
9 (or other uremic toxins) reduce CaSR expression in monocytes remains to be explored. The  
10  
11 observation that surface monocyte CaSR expression is associated with CKD independently of  
12  
13 total monocyte CaSR expression suggests that in monocytes isolated from patients with CKD,  
14  
15 CaSR synthesis as well as trafficking to the cytoplasmic membrane and recycling are  
16  
17 modified<sup>18</sup>, as compared to monocytes isolated from healthy individuals. This is an important  
18  
19 issue and requires further investigation.  
20  
21  
22

23  
24 In the present study, total serum 25(OH) vitamin D<sub>3</sub> was independently associated with CaSR  
25  
26 expression suggesting that disturbances in the vitamin D – vitamin D receptor axis of CKD  
27  
28 could constitute another mechanism contributing to the observed downregulation of monocyte  
29  
30 CaSR. 25(OH) vitamin D<sub>3</sub> can modulate CaSR expression through direct affinity to VDR<sup>19</sup>  
31  
32 or through local transformation towards active 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> since 1 alpha-  
33  
34 25(OH) hydroxylase remains active in CKD monocytes<sup>20</sup>. We recently demonstrated that  
35  
36 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> was able to increase CaSR expression in monocytic U-937 cells<sup>21</sup> as  
37  
38 well as in vascular smooth muscle cells<sup>22</sup>. Moreover, we also found that vitamin D  
39  
40 supplementation given to 20 healthy volunteers for 15 weeks led to a 20% increase in total  
41  
42 CaSR expression in PBMCs although the increase failed to reach the level of statistical  
43  
44 significance, probably due to small sample size<sup>21</sup>. Upregulation of CaSR expression by  
45  
46 vitamin D is not surprising since it is well known that the two promoters of the CaSR gene  
47  
48 (P1 and P2) have functional vitamin D response elements. By this mechanism, vitamin D  
49  
50 sterols upregulate CaSR expression in the parathyroid, making the gland more sensitive to  
51  
52 extracellular calcium<sup>23</sup>. Whether active vitamin D metabolites also upregulate monocyte  
53  
54 CaSR expression in CKD patients remains to be demonstrated.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Cardiovascular mortality increases as CKD progresses<sup>24</sup>. The increased mortality risk is  
4 associated with various factors such as vascular calcification<sup>25,26</sup>, uremic toxins including  
5 PCS<sup>27</sup>, vitamin D deficiency<sup>28,29</sup>, and a pro-inflammatory state<sup>30,31</sup>. We hypothesized that the  
6 observed decrease in monocyte CaSR expression might reflect the inflammatory state of  
7 CKD, which in turn is known to favor vascular calcification<sup>32</sup>. Remarkably, we have been  
8 able to show in *in vitro* experiments that cells of different murine or human monocyte  
9 lineages were able (in a dose-dependent manner) not only to prevent calcium deposition, but  
10 also to resorb already formed deposits. The ability to interfere with vascular calcification was  
11 modulated according to CaSR activity and expression, and required cellular contact with  
12 calcium deposits. This suggests that monocytes act through CaSR dependent  
13 macropinocytosis and not through the secretion of soluble factor such as proteins, enzymes  
14 and/or cytokines. Our findings are in accord with the recent discovery of a constitutive role of  
15 CaSR in cellular macropinocytosis<sup>33</sup>. Unlike CaSR total monocyte expression, the decrease of  
16 surface monocyte CaSR expression correlated tightly with the loss of monocytes' ability to  
17 prevent arterial calcium deposition. This is consistent with receptor activation at the  
18 membrane and compatible with the hypothesis that a decrease in monocyte CaSR expression  
19 favors vascular calcification in CKD. However, this association needs to be further  
20 investigated in a prospective trial assessing vascular calcification by quantitative imaging  
21 procedures<sup>34</sup>.

22  
23  
24 Adding the calcimetic NPS-R568 to the culture medium improved the calcification-inhibitory  
25 activity of monocytes isolated from CKD patients *in vitro*, suggesting potential clinical  
26 benefit. Similar inhibitory effects of calcimimetic on arterial calcification have previously  
27 been reported in chronic hemodialysis patients (ADVANCE trial)<sup>35</sup>. It is also noteworthy in  
28 this context that the calcimimetic cinacalcet has been shown to reduce the incidence of  
29 calcific uremic arteriopathy in hemodialysis patients with moderate to severe secondary  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 hyperparathyroidism<sup>36</sup>. The cardioprotective effects of cinacalcet are still controversial. They  
4 have at least been shown in some subpopulations, as for instance in people of younger age  
5  
6 with moderate secondary hyperparathyroidism, and in patients without diabetes as compared  
7  
8 to those with diabetes<sup>37</sup>. This is compatible with a more marked inhibitory effect of NPS-  
9  
10 R568 in patients with reduced surface monocyte CaSR expression. Considering our results in  
11  
12 this context, monocyte CaSR expression may represent a potential therapeutic target or at  
13  
14 least a biological marker to determine subgroups of calcimimetic responders.  
15  
16  
17  
18  
19

20 Given the pleiotropic biological effects of monocyte CaSR, it could play a role in other  
21  
22 complications associated with CKD. The CaSR is known to synergize with chemokines to  
23  
24 favor monocyte migration<sup>10</sup>, and to exert both pro-inflammatory<sup>11,12</sup> and anti-inflammatory  
25  
26 effects<sup>38</sup>. Thus, on the one hand, the CaSR antagonist NPS 2143 was able to protect against  
27  
28 lipopolysaccharide induced acute lung injury *in vivo*<sup>13</sup>. On the other hand, monocyte CaSR  
29  
30 activation has been shown to switch the pro-inflammatory M1 macrophage phenotype to the  
31  
32 anti-inflammatory M2 phenotype<sup>38</sup>. CKD is also characterized by a higher rate of bacterial  
33  
34 infection, the mechanisms of which are not fully elucidated<sup>15</sup>. Recently Canton et al showed  
35  
36 that the CaSR signals constitutive macropinocytosis in macrophages through  
37  
38 phosphatidylinositol 3-kinase, a mechanism supporting the uptake of antigens for subsequent  
39  
40 presentation<sup>33</sup>. Beyond reduction of calcification management, the observed decrease of  
41  
42 monocyte CaSR in CKD may result in the loss of sentinel ability that would contribute to  
43  
44 immune dysfunction. Finally, it is well known that the CaSR plays an important role in the  
45  
46 differentiation of osteoclasts, which originate from hematopoietic stem cells<sup>39</sup>. Loss of CaSR  
47  
48 expression in monocyte lineage might therefore also contribute to the abnormal bone turnover  
49  
50 associated with CKD. This hypothesis deserves further study.  
51  
52  
53  
54  
55

56  
57 The present study had limitations and strengths. The main limitations lie in the absence of  
58  
59 scans quantifying vascular calcifications in patients, the cross-sectional design of the study,  
60

1  
2  
3 and the lack of precise identification of the mechanism explaining the variation of monocyte  
4  
5 CaSR expression in CKD. The strengths include the translational nature of the work, the  
6  
7 quantification of both membrane and total CaSR expression in monocytes, the independence  
8  
9 of the association between membrane CaSR and eDFG CKD EPI, and in the striking  
10  
11 correlation between monocyte CaSR and monocyte anti-calcifying capacity.  
12  
13

14  
15 In conclusion, we demonstrate a decrease in CaSR expression in CD14+ monocytes of  
16  
17 patients with CKD. Exposure of monocytes to serum of CKD patients similarly reduces CaSR  
18  
19 expression *in vitro*. We further demonstrate that monocytes are able to reduce and even resorb  
20  
21 carotid artery mineral deposits *in vitro*, and that this capacity depends on normal CaSR  
22  
23 expression and/or CaSR activation. The CKD induced reduction of monocyte CaSR  
24  
25 expression therefore appears to enhance vascular calcification *in vitro*. Whether abnormal  
26  
27 monocyte CaSR expression and function contribute to the progression of vascular  
28  
29 calcification in patients with CKD deserves further investigation.  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Materials and Methods

### Studies design

Human subjects were included in two parallel studies.

The first study enrolled adult blood donor volunteers who were recruited by the Clinical Center of University hospital in Amiens, France, as reported previously<sup>21</sup>. We included healthy people aged 18 - 75 years. Exclusion criteria were chronic kidney disease, inflammatory disease, previous cardiovascular event, cancer, acute infectious disease, and primary hyperparathyroidism. All healthy volunteers were supplemented by cholecalciferol (100 000 UI every 2 weeks with a total dose depending to initial vitamin D status as recommended by GRIQO guidelines<sup>40</sup>) before blood sampling.

1  
2  
3 The second study enrolled patients with CKD at the outpatient nephrology clinic of the  
4  
5 University hospital of Amiens, France. Inclusion criteria were age 18 - 80 years, a confirmed  
6  
7 diagnosis of CKD by two consecutive measures of CKD-EPI eGFR < 80 mL/min/1.73m<sup>2</sup> or  
8  
9 patients receiving dialysis therapy for more than 3 months. Exclusion criteria were the same  
10  
11 as those for the healthy volunteers above, with the exception of CKD. Patients with a recent  
12  
13 (< 3 month) decrease of eGFR > 30% were also excluded. From all CKD patients who  
14  
15 accepted to participate at the study blood samples were taken directly after the outpatient  
16  
17 clinic.  
18  
19  
20  
21

22 The two pilot studies were thought to have a common secondary outcome, targeting the  
23  
24 identification of clinical and the laboratory parameters (in particular those related to CKD)  
25  
26 associated with the CaSR expression in monocytes.  
27  
28

29 All subjects gave their written informed consent. The study protocols were approved by a  
30  
31 local independent ethics committee (*Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest II*,  
32  
33 Amiens, France; references 2011-A01449-32 and 2011-A01448-33, respectively) and the  
34  
35 French National Agency for Medicines and Health Product Safety. The procedures followed  
36  
37 were in accordance with the Helsinki Declaration.  
38  
39  
40  
41

#### 42 **Routine biochemistry laboratory parameters**

43  
44

45 Laboratory measures were performed both in healthy volunteers and in CKD patients. Serum  
46  
47 calcium (Ca), phosphate (Pi), albumin, creatinine, and highly sensitive C-reactive (HS-CRP)  
48  
49 and blood haemoglobin were analysed in one-site biochemistry laboratory using autoanalyzer  
50  
51 techniques. Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated by Chronic Kidney  
52  
53 Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formula. Serum intact PTH (iPTH 1-84) was  
54  
55 determined by a chemiluminometric immunoassay (Liaison N-tact PTH CLIA; Diasorin,  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Stillwater, Minnesota, USA). Serum 25 OH vitamin D was assayed using chemiluminescent  
4 immunoassay (Liaison 25 OH Vitamin D Total Assay, Diasorin, Stillwater, USA).  
5  
6  
7

### 8 **Uremic toxins measurements**

9

10  
11 Three uremic toxins (paracresylsulfate [PCS], Indoxyl Sulfate [IS], indol acetic acid [IAA])  
12 were assayed on 200  $\mu$ L of serum. After serum protein precipitation with methanol,  
13 evaporation with nitrogen, and resuspension in 100  $\mu$ L of acetonitrile-0.1 M ammonium  
14 formiate buffer, the total concentrations of the three uremic toxins were measured by high  
15 performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection set at 270 nm  
16 (Alliance system, Waters®, Milford, Massachusetts, USA), using a Nova-Pak 4  $\mu$ m, 3.9 mm  
17 X 150 mm C18 column (Ref. WAT036975, Waters®, Milford, Massachusetts, USA) and a  
18 gradient solvent system of acetonitrile-0.1 M ammonium formiate buffer, pH 3, at a 0.8  
19 ml/min flow-rate. The lower limit of quantification (LLOQ) was 0.2  $\mu$ g/mL for IS and IAA  
20 and 0.5  $\mu$ g/mL for PCS. The method was linear from the LLOQ to 50  $\mu$ g/mL with a  
21 correlation coefficient over 0.999. The intraday and interday coefficients of variation were all  
22 less than 15% and biases ranged from -12.9% to 7.1%.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

### 39 **PBMC isolation and culture**

40

41  
42 Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from 8 mL of blood sample.  
43  
44 Samples were centrifugated on Ficoll (Histopaque 1077® ref 1077-1) at 1800 rpm during 25  
45 min. Interphase containing PBMCs was collected and washed with PBS-0.5% BSA. Cells  
46 were harvested after a last centrifugation (1800 rpm; 10 min) and were mixed either in 2 mL  
47 of fetal bovine serum (FBS) – 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) for healthy volunteers, either  
48 in 3mL of their own serum – 10% DMSO for CKD patients. Cells were then frozen  
49 progressively and were conserved for long period at -150°C.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 PBMCs were cultured in 6-wells plate in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI,  
4 Sigma Aldrich®), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM GlutaMAX™  
5 (Invitrogen), 100 UI/mL penicillin-streptomycin (Sigma Aldrich®). To study the effect of  
6 patient sera on CaSR expression, PBMCs were cultured during 48h with increasing  
7 concentration of serum (from 1% to 30%). The effects of two types of serum were compared:  
8 pool of serum from healthy donors (IPLA-SER-500 mL SERPIME) and pool of serum from  
9 hemodialysis patients (unused serum during routine laboratory tests, obtained in accordance  
10 with French legislation). These sera were characterized both by biochemistry laboratory using  
11 autoanalyzer techniques, and by quantification of uremic toxins concentrations.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

#### 24 **Quantification of CaSR expression in monocytes**

25  
26  
27 CaSR expression was quantified by flow cytometry at the level of the monocyte membrane  
28 and in whole permeabilized monocytes. When required, permeabilization was obtained by  
29 incubation of 100 µL of BD Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences®, 5554715) solution for  
30 20 min, following manufacturer's instruction. After washes in PBS-0.5% BSA (Sigma-  
31 Aldrich®), PBMCs were incubated with 10 µL of CaSR monoclonal antibody 1:40 (5C10,  
32 ADD, Abcam®, ab19347) or with control IgG2a (X0943, DakoCytomation) for 30 min at  
33 4°C in the dark. After washes in PBS-0.5% BSA, PBMCs were marked with Phycoerythrin-  
34 conjugated IgG mouse antibodies (Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/RPE [R  
35 0480, DakoCytomation]) for 15 min at 4°C in the dark. To detect monocyte population from  
36 PBMCs, a CD14 labelling was performed by incubating PBMCs with anti-CD14 antibodies  
37 conjugated to FITC 1:4 (mouse mAb anti-C14-FITC 130-080-701, MACS Miltenyi Biotec) or  
38 with monoclonal Mouse IgG2a isotype control antibodies conjugated with FITC (130-091-  
39 837, MACS Miltenyi Biotec) for 30 min at 4°C in the dark. After a last wash with PBS-0.5%  
40 BSA, surface ant total CaSR expression of CD14+ PBMCs was then assayed by FACS Canto  
41 II (BD Biosciences®). CaSR monocyte expression was performed on thawed PBMCs, by  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 series using 20 different samples, each time in duplicate. To compare CaSR expression from  
4  
5 different series, a minimum of 4 common samples were used between each series in order to  
6  
7 apply a linear correction factor.  
8  
9

### 10 ***In vitro* vascular calcification assay**

11  
12 Rat carotid calcification was obtained as reported previously<sup>41</sup>. Briefly, after careful removal  
13  
14 of most of the carotid adventice of 2 months old Wistar rats, carotid artery segments 3-4 mm  
15  
16 in length were incubated at 37°C and in 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
17  
18 (DMEM - D6546 Sigma-Aldrich®), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1%  
19  
20 GlutaMAX™ and 1% penicillin/streptomycin (called hereafter complete DMEM). To induce  
21  
22 carotid calcification, the arterial segments were exposed to complete DMEM in which Pi  
23  
24 concentration was increased from 0.9 to 3.8 mM by adding Pi as NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (S5011, Sigma-  
25  
26 Aldrich®). The medium was changed every 2 days for a total of 5 days. Some carotids were  
27  
28 exposed to monocytes (U937, THP-1) or PBMCs either during those 5 days of culture (called  
29  
30 hereafter 'preventive model'), or during an additional culture period, which started from the  
31  
32 end of the pro-calcifying culture period and lasted for 5 days (called hereafter 'curative  
33  
34 model'). In the curative model, pre-calcified carotids and monocytes were cultured in  
35  
36 complete DMEM in which the concentration of Pi remained unchanged as compared to  
37  
38 DMEM (0.9 mM).  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

### 47 **CaSR agonist or antagonist pretreatment**

48  
49 In order to evaluate the role of monocyte CaSR in the *in vitro* calcification model, we pre-  
50  
51 exposed the cells (PBMC or monocytic lineage) with a calcimimetics (NSP-R568 – 100 nM;  
52  
53 3815, Tocris®) or a calcilytic (NPS 2143 – 41 nM; 3626, Tocris®) 30 min before their  
54  
55 introduction on the carotid arteries. Just before introduction the cells were washed twice with  
56  
57 DMEM to avoid any direct effect of CaSR agonists or antagonists on the carotid arteries.  
58  
59  
60

### Quantification of calcium deposition

As previously described<sup>41</sup>, carotid segments were decalcified with 0.6 N HCl overnight at 4°C. The calcium content in the HCl supernatant was assessed using the o-cresolphthalein complexone method. Briefly, a solution of ortho-cresolphthalein complexone at 300 µM (P5631, Sigma-Aldrich®) was prepared with 8-hydroxyquinoline 16 mM (252565, Sigma-Aldrich®) in 2-amino-2-methyl-1-propanol 0.5 M distilled water solution (pH=10.5; Sigma-Aldrich®) and heated for 2 h. For the quantification, 25 µl of HCl supernatants were added to 150 µl of ortho-cresolphthalein solution before to take the absorbance at 565 nm. Calcium content was corrected by carotid dry weight.

### Confocal microscopy

Localization of mineral deposition was stained by a red luminescent dye Osteosense® 680 EX (Perkin-Elmer, NEV10020EX, 10 µl/ml; 24h at 37°C). Monocyte cells were detected by using fluorescent PKH26 (PKH26GL Sigma-Aldrich®) staining according to the manufacturer's protocol. Emission at 567 nm was coded as green color to visually separate with the 680 nm wavelength of Osteosense®. Cells were observed with confocal microscope and pictures acquired with Zeiss LSM780.

### Statistical analysis

The populations of the two studies were regrouped and analyzed depending to their eGFR-CKD-EPI and separated in three groups (eGFR  $\geq$  60 mL.min<sup>-1</sup>, eGFR  $\in$  [30-59 mL.min<sup>-1</sup>], eGFR < 30 mL.min<sup>-1</sup>). Laboratory and clinical variables were quoted as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Qualitative variables were quoted as the number (frequency). ANOVA followed by Tukey post-tests were applied for quantitative variables, whereas the Likelihood-ratio test was applied for qualitative variables. In order to determine parameters associated with CaSR expression of monocyte (surface or total) higher than the median CaSR

1  
2  
3 expression, a univariate logistic regression was performed. Variables significantly associated  
4  
5 in univariate analysis were included in a multivariable logistic regression model using a top-  
6  
7 down method based on the likelihood ratio.  
8  
9

10 For the *in vitro* experiments, results were represented in scatter-plot with median and  
11  
12 interquartile range. Differences between groups were analysed using Kruskal-Wallis test  
13  
14 followed by Mann Whitney post-tests or Tukey post-tests. A Wilcoxon test was used for  
15  
16 matched groups. Association between CaSR expression and calcification deposition was  
17  
18 determined by Pearson correlation.  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

#### 26 **Disclosure statement**

27  
28 The authors have no conflicts of interest to disclose in connection with the study. The study  
29  
30 was funded by public support.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



## References

1. Chen RA, Goodman WG. Role of the calcium-sensing receptor in parathyroid gland physiology. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(6):F1005-1011. doi:10.1152/ajprenal.00013.2004
2. Gogusev J, Duchambon P, Hory B, et al. Depressed expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 1997;51(1):328-336.
3. Goodman WG, Quarles LD. Development and progression of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease: lessons from molecular genetics. *Kidney Int*. 2007;74(3):276-288. doi:10.1038/sj.ki.5002287
4. Molostvov G, Fletcher S, Bland R, Zehnder D. Extracellular calcium-sensing receptor mediated signalling is involved in human vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis. *Cell Physiol Biochem*. 2008;22(5-6):413-422. doi:10.1159/000185484
5. Caudrillier A, Mentaverri R, Brazier M, Kamel S, Massy ZA. Calcium-sensing receptor as a potential modulator of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Nephrol*. 2010;23(1):17-22.
6. Mathias RS, Nguyen HT, Zhang MY, Portale AA. Reduced expression of the renal calcium-sensing receptor in rats with experimental chronic renal insufficiency. *JASN*. 1998;9(11):2067-2074.
7. Piecha G, Kokeny G, Nakagawa K, et al. Calcimimetic R-568 or calcitriol: equally beneficial on progression of renal damage in subtotaly nephrectomized rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294(4):F748-757. doi:10.1152/ajprenal.00220.2007
8. Massy ZA, Hénaut L, Larsson TE, Vervloet MG. Calcium-sensing receptor activation in chronic kidney disease: effects beyond parathyroid hormone control. *Semin Nephrol*. 2014;34(6):648-659. doi:10.1016/j.semnephrol.2014.10.001
9. House MG, Kohlmeier L, Chattopadhyay N, et al. Expression of an extracellular calcium-sensing receptor in human and mouse bone marrow cells. *J Bone Miner Res*. 1997;12(12):1959-1970. doi:10.1359/jbmr.1997.12.12.1959
10. Olszak IT, Poznansky MC, Evans RH, et al. Extracellular calcium elicits a chemokinetic response from monocytes in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 2000;105(9):1299-1305. doi:10.1172/JCI9799
11. Xi Y, Li H, Zhang W, et al. The functional expression of calcium-sensing receptor in the differentiated THP-1 cells. *Mol Cell Biochem*. 2010;342(1-2):233-240. doi:10.1007/s11010-010-0489-3
12. Lee G-S, Subramanian N, Kim AI, et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Nature*. 2012;492(7427):123-127. doi:10.1038/nature11588
13. Lee J-W, Park HA, Kwon O-K, et al. NPS 2143, a selective calcium-sensing receptor antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation. *Mol Immunol*. 2017;90:150-157. doi:10.1016/j.molimm.2017.07.012

14. Ganda A, Magnusson M, Yvan-Charvet L, et al. Mild renal dysfunction and metabolites tied to low HDL cholesterol are associated with monocytosis and atherosclerosis. *Circulation*. 2013;127(9):988-996. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000682
15. Betjes MGH. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(5):255-265. doi:10.1038/nrneph.2013.44
16. Manzoor S, Ahmed S, Ali A, et al. Progression of Medial Arterial Calcification in CKD. *Kidney International Reports*. 2018;3(6):1328-1335. doi:10.1016/j.ekir.2018.07.011
17. Ureña Torres PA, De Broe M. Calcium-sensing receptor, calcimimetics, and cardiovascular calcifications in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2012;82(1):19-25. doi:10.1038/ki.2012.69
18. Breitwieser GE. Minireview: The Intimate Link Between Calcium Sensing Receptor Trafficking and Signaling: Implications for Disorders of Calcium Homeostasis. *Mol Endocrinol*. 2012;26(9):1482-1495. doi:10.1210/me.2011-1370
19. Ritter CS, Armbrecht HJ, Slatopolsky E, Brown AJ. 25-Hydroxyvitamin D(3) suppresses PTH synthesis and secretion by bovine parathyroid cells. *Kidney Int*. 2006;70(4):654-659. doi:10.1038/sj.ki.5000394
20. Gallieni M, Kamimura S, Ahmed A, et al. Kinetics of monocyte 1 alpha-hydroxylase in renal failure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1995;268(4):F746-F753. doi:10.1152/ajprenal.1995.268.4.F746
21. Paccou J, Boudot C, Mary A, et al. Determination and modulation of total and surface calcium-sensing receptor expression in monocytes in vivo and in vitro. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e74800. doi:10.1371/journal.pone.0074800
22. Mary A, Hénaut L, Boudot C, et al. 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
23. Canaff L, Hendy GN. Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Biol Chem*. 2002;277(33):30337-30350. doi:10.1074/jbc.M201804200
24. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351(13):1296-1305. doi:10.1056/NEJMoa041031
25. London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(9):1731-1740. doi:10.1093/ndt/gfg414
26. Cano-Megías M, Guisado-Vasco P, Bouarich H, et al. Coronary calcification as a predictor of cardiovascular mortality in advanced chronic kidney disease: a prospective long-term follow-up study. *BMC Nephrol*. 2019;20(1):188. doi:10.1186/s12882-019-1367-1
27. Lin C-J, Wu V, Wu P-C, Wu C-J. Meta-Analysis of the Associations of p-Cresyl Sulfate (PCS) and Indoxyl Sulfate (IS) with Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients with Chronic Renal Failure. *PLoS ONE*. 2015;10(7):e0132589. doi:10.1371/journal.pone.0132589

- 1  
2  
3 28. Barreto DV, Barreto FC, Liabeuf S, et al. Vitamin D affects survival independently of  
4 vascular calcification in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(6):1128-1135.  
5 doi:10.2215/CJN.00260109  
6
- 7 29. Lu RJ, Zhu SM, Tang FL, et al. Effects of vitamin D or its analogues on the mortality of  
8 patients with chronic kidney disease: an updated systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin*  
9 *Nutr*. 2017;71(6):683-693. doi:10.1038/ejcn.2017.59  
10
- 11 30. Menon V, Greene TOM, Wang X, et al. C-reactive protein and albumin as predictors of all-  
12 cause and cardiovascular mortality in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2005;68(2):766-772.  
13 doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00455.x  
14
- 15 31. Munoz Mendoza J, Isakova T, Cai X, et al. Inflammation and elevated levels of fibroblast  
16 growth factor 23 are independent risk factors for death in chronic kidney disease. *Kidney Int*.  
17 2017;91(3):711-719. doi:10.1016/j.kint.2016.10.021  
18
- 19 32. Buendía P, Montes de Oca A, Madueño JA, et al. Endothelial microparticles mediate  
20 inflammation-induced vascular calcification. *FASEB J*. 2015;29(1):173-181. doi:10.1096/fj.14-  
21 249706  
22
- 23 33. Canton J, Schlam D, Breuer C, Gütschow M, Glogauer M, Grinstein S. Calcium-sensing  
24 receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in  
25 macrophages. *Nat Commun*. 2016;7:11284. doi:10.1038/ncomms11284  
26
- 27 34. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R. Quantification  
28 of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol*.  
29 1990;15(4):827-832.  
30
- 31 35. Raggi P, Chertow GM, Torres PU, et al. The ADVANCE study: a randomized study to  
32 evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on  
33 hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(4):1327-1339. doi:10.1093/ndt/gfq725  
34
- 35 36. Pasch A, Block GA, Bachtler M, et al. Blood Calcification Propensity, Cardiovascular  
36 Events, and Survival in Patients Receiving Hemodialysis in the EVOLVE Trial. *Clin J Am Soc*  
37 *Nephrol*. 2017;12(2):315-322. doi:10.2215/CJN.04720416  
38
- 39 37. Friedl C, Reibnegger G, Kramar R, et al. Mortality in dialysis patients with cinacalcet use:  
40 A large observational registry study. *Eur J Intern Med*. 2017;42:89-95.  
41 doi:10.1016/j.ejim.2017.05.002  
42
- 43 38. Chen Z, Wu C, Gu W, Klein T, Crawford R, Xiao Y. Osteogenic differentiation of bone  
44 marrow MSCs by  $\beta$ -tricalcium phosphate stimulating macrophages via BMP2 signalling pathway.  
45 *Biomaterials*. 2014;35(5):1507-1518. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.014  
46
- 47 39. Mentaverri R, Yano S, Chattopadhyay N, et al. The calcium sensing receptor is directly  
48 involved in both osteoclast differentiation and apoptosis. *FASEB J*. 2006;20(14):2562-2564.  
49 doi:10.1096/fj.06-6304fje  
50
- 51 40. Benhamou C-L, Souberbielle J-C, Cortet B, Fardellone P, Gauvain J-B, Thomas T. La  
52 vitamine D chez l'adulte: recommandations du GRIO. *Presse Med*. 2011;40:673-682.  
53
- 54 41. Hodroge A, Trécherel E, Cornu M, et al. Oligogalacturonic Acid Inhibits Vascular  
55 Calcification by Two Mechanisms: Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Osteogenic  
56 Conversion and Interaction With Collagen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(7):1391-  
57 1401. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309513  
58  
59  
60

## Acknowledgements

We thank the clinical staff at the Center for Clinical Investigations of Amiens-Picardie hospital, Amiens, France for the inclusion of subjects. We further thank the Human Biology Center of Amiens hospital for the measurement of biochemical parameters and Agnes Boullier, Ph.D. for providing sera from healthy persons and from patients with CKD, respectively. Cytometry and confocal microscopy was performed at the “Plateforme d’imagerie cellulaire et d’analyse des protéines” (ICAP).

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of healthy volunteers and patients with CKD.

	eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )				p value
	Total	≥ 60	[30-60[	< 30	
n	60	20	25	15	
eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	46.9 ± 23.7	76.6 ± 12.7 a,b	42.6 ± 8.9 <sup>a,c</sup>	15.4 ± 6.7 <sup>b,c</sup>	<0.001
Serum creatinine (μmol.L <sup>-1</sup> )	182 ± 155	88 ± 13 <sup>b</sup>	133 ± 24 <sup>c</sup>	391 ± 188 <sup>b,c</sup>	<0.001
Age (years)	59.9 ± 14.7	53.2 ± 16.6 <sup>a</sup>	63.9 ± 12.3 <sup>a</sup>	62.4 ± 13.7	0.038
Gender (male)	28 (47%)	9 (45%)	9 (36%)	10 (67%)	0.167
Serum total Ca (mmol.L <sup>-1</sup> )	2.31 ± 0.14	2.30 ± 0.08	2.34 ± 0.10	2.26 ± 0.23	0.173
Serum PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mmol.L <sup>-1</sup> )	1.10 ± 0.23	1.02 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.07 ± 0.23 <sup>c</sup>	1.27 ± 0.20 <sup>b,c</sup>	0.002
Serum PCS (μg.mL <sup>-1</sup> )	16.7 ± 22.1	4.7 ± 7.2 <sup>b</sup>	11.1 ± 12.4 <sup>c</sup>	41.0 ± 28.0 <sup>b,c</sup>	<0.001
Serum IS (μg.mL <sup>-1</sup> )	5.8 ± 10.2	1.0 ± 1.6 <sup>b</sup>	4 ± 7.8 <sup>c</sup>	14.6 ± 14.1 <sup>b,c</sup>	<0.001
Serum IAA (μg.mL <sup>-1</sup> )	0.85 ± 0.38	0.67 ± 0.24 <sup>b</sup>	0.84 ± 0.30	1.10 ± 0.52 <sup>b</sup>	0.003
Serum i-PTH (pg.mL <sup>-1</sup> )	106 ± 117	47 ± 44 <sup>b</sup>	91 ± 75 <sup>c</sup>	216 ± 170 <sup>b,c</sup>	<0.001
Serum 25(OH) vitD <sub>3</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> )	30.2 ± 12.3	34.4 ± 11	27.8 ± 12.6	28.8 ± 12.7	0.184
Blood Hb (g.dL <sup>-1</sup> )	13.2 ± 1.5	14.4 ± 1.2 <sup>a,b</sup>	13.3 ± 1.0 <sup>a,c</sup>	11.7 ± 1.2 <sup>b,c</sup>	<0.001
Serum albumin (g.L <sup>-1</sup> )	42.3 ± 4.2	44 ± 3.2	41.2 ± 4.7	42.3 ± 3.6	0.094
Serum CRP (mg.mL <sup>-1</sup> )	6.4 ± 19.4	4.1 ± 4.6	3.5 ± 2.1	14.9 ± 39.2	0.175
Monocyte total CaSR (AU)	674 ± 392	901 ± 480 <sup>a,b</sup>	589 ± 303 <sup>a</sup>	514 ± 253 <sup>b</sup>	0.004
Monocyte surface CaSR (AU)	319 ± 72	365 ± 73 <sup>a,b</sup>	307 ± 60 <sup>a</sup>	280 ± 60 <sup>b</sup>	<0.001

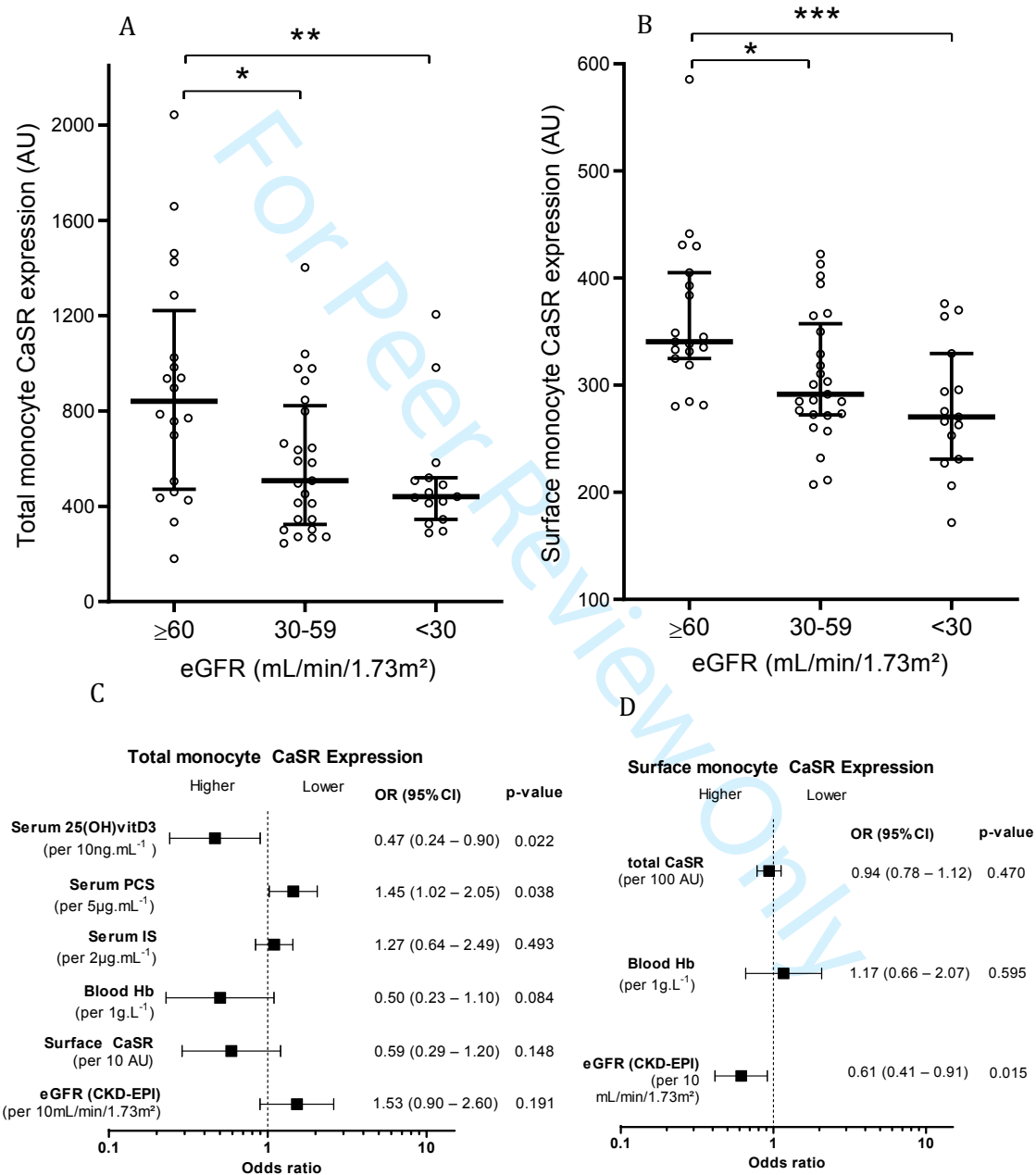
1  
2  
3  
4  
5  
6 Healthy volunteers and CKD patients have been subdivided into three groups according to  
7  
8 their eGFR calculated by CKD-EPI formula. Values are indicated as means (SD) or  
9  
10 frequency. The p value indicated has been calculated by ANOVA or  $\chi^2$  test.  
11  
12

13  
14 <sup>a</sup> p<0.05 eGFR  $\geq$  60 mL. min<sup>-1</sup> comparatively to [30-60[ mL/min/1.73m<sup>2</sup>. <sup>b</sup> p<0.05 p<0.05  
15  
16 eGFR  $\geq$  60 mL/min/1.73m<sup>2</sup> comparatively to <30 mL/min/1.73m<sup>2</sup>. <sup>c</sup> p<0.05 eGFR [30-60[  
17  
18 mL/min/1.73m<sup>2</sup> <30 mL/min/1.73m<sup>2</sup> (Tukey post-test).  
19  
20

21 25(OH) vitD<sub>3</sub>: 25 hydroxy-vitamin D<sub>3</sub>. AU: arbitrary units. CaSR : Calcium Sensing  
22  
23 Receptor. CRP: C-Reactive Protein. eGFR: estimated glomerular filtration rate. Hb:  
24  
25 hemoglobin. IAA: indole acetic acid. i-PTH: intact parathyoid hormone. IS: indoxyl sulfate.  
26  
27 PCS: paracresyl sulfate.  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Figures and legends

Figure 1



1  
2  
3 **Calcium Sensing Receptor (CaSR) expression in CD14+ peripheral blood mononuclear**  
4 **cells (PBMC) according to estimated glomerular filtration rate (eGFR) in healthy**  
5 **subjects and CKD stage 3-5 patients (n = 60)**  
6  
7  
8  
9

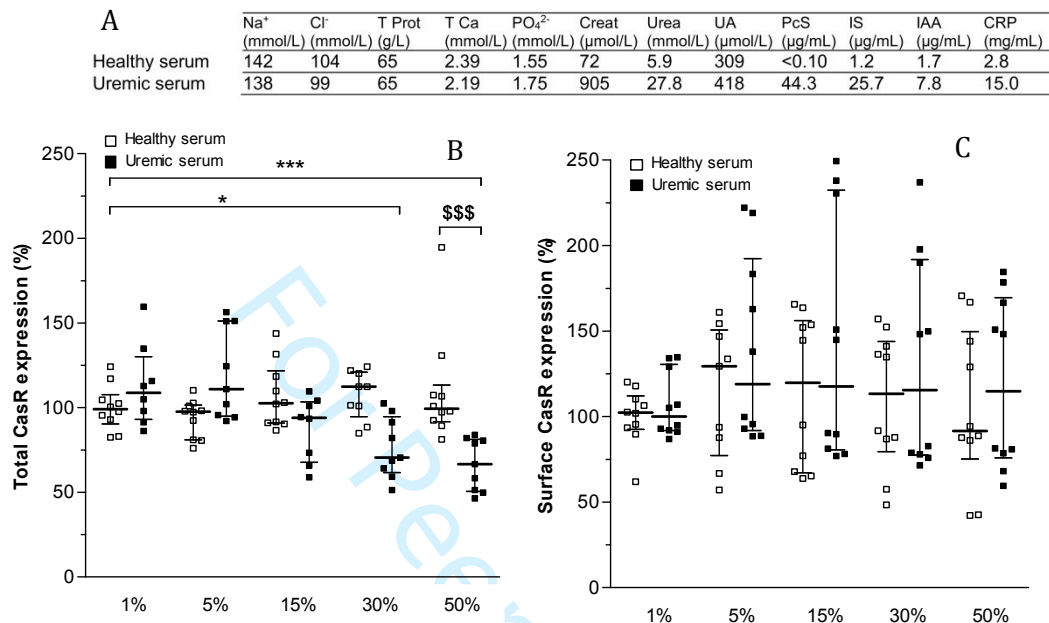
10 A. and B. Protein CaSR expression was assessed by flow cytometry in PBMC respectively on  
11 whole monocyte or monocyte membrane. Three groups of patients were examined according  
12 to their eGFR, as estimated by CKD-EPI formula. Box-plots represent median, interquartile,  
13 minimum, and maximum values. ANOVA p-values were 0.0041 and 0.0007 for total and  
14 surface expression respectively. B. Association of various parameters with CaSR expression  
15 below the median assessed using multivariable logistic regression analysis. Variables were  
16 included in the model if they were associated in univariate analysis with  $p < 0.05$ . Odds ratio  
17 was expressed per increment of the quantitative variables. 25(OH) vitD<sub>3</sub>: 25 hydroxy vitamin  
18 D<sub>3</sub>. AU: arbitrary units. Hb: hemoglobin. IS: indoxyl sulfate. PCS: paracresyl sulfate.  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

31  
32 \*  $p < 0.05$  versus  $eGFR \geq 60$  mL/min/1.73m<sup>2</sup>. \*\*  $p < 0.01$  versus  $eGFR \geq 60$  mL/min/1.73m<sup>2</sup>.  
33

34 \*\*\*  $p < 0.001$  versus  $eGFR \geq 60$  mL/min/1.73m<sup>2</sup> AU: arbitrary unit.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Figure 2



### Impact of uremic status on monocyte Calcium Sensing Receptor (CaSR) expression.

A. Biochemical parameter values of pooled sera collected from healthy donors and from chronic hemodialysis patients. B. and C. CaSR expression in CD14<sup>+</sup> PBMCs was assessed by flow cytometry after 48 h of incubation with increasing amounts of serum respectively on whole monocyte or monocyte membrane. White and grey bars show the results for healthy and uremic sera, respectively (means  $\pm$  standard deviation). Experiments were performed in triplicate in PBMCs from 4 different donors. (Kruskal Wallis p-value is  $<0.0001$ . \*  $p < 0.05$  versus control (1% healthy serum). \*\*\*  $p < 0.001$  versus control (1% healthy serum). \$\$\$  $p < 0.001$  (Tukey post-tests).

PBMCs: peripheral blood mononuclear cells. Creat: creatinine. CRP: C-reactive protein. IAA: indole acetic acid. IS: indoxyl sulfate. PCS: paracresyl sulfate. Prot: Proteins. T: Total.

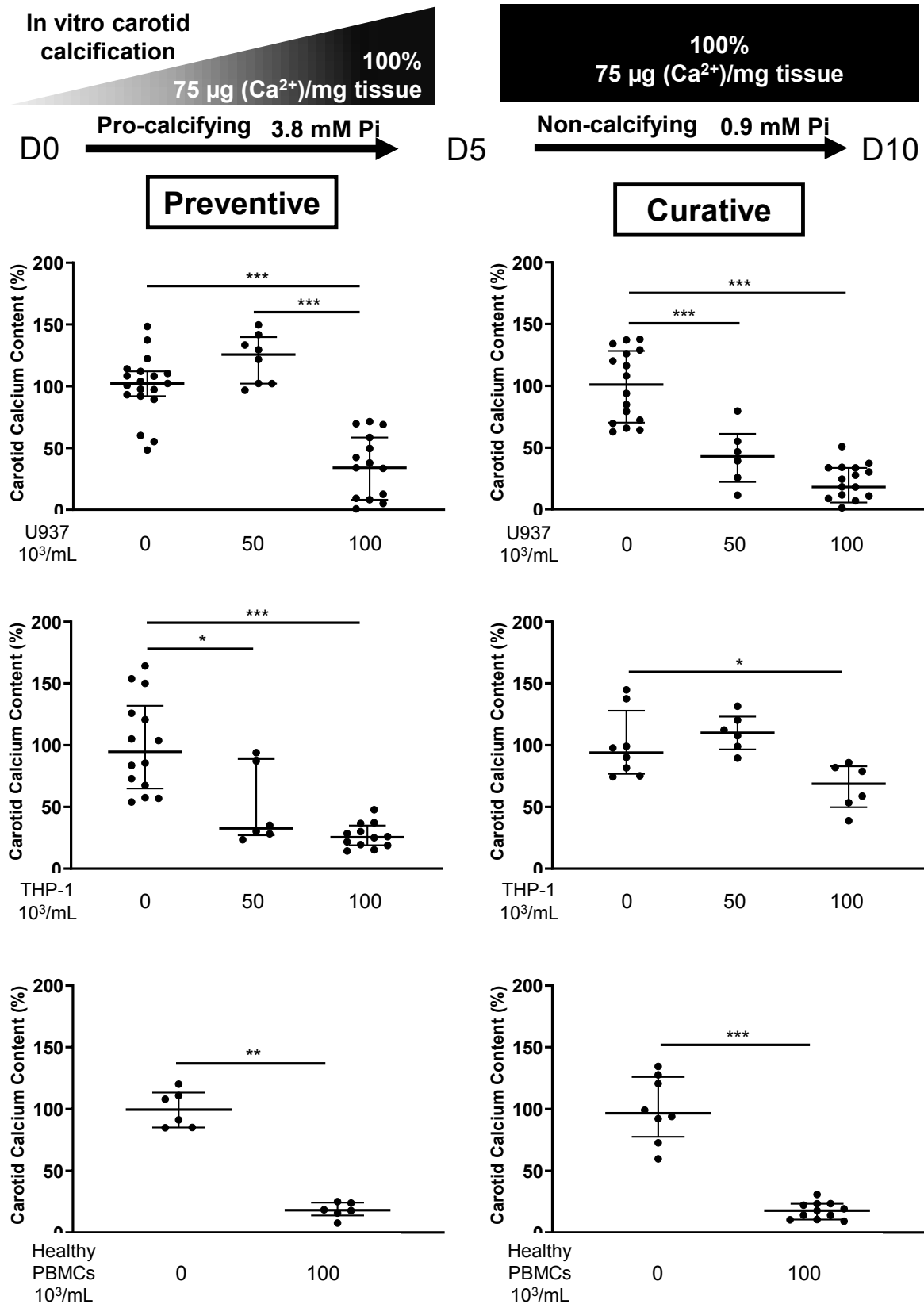


Figure 3

## **Reduction of rat carotid calcium content by addition of monocytes cells or Peripheral Blood Mononuclear Cells**

Monocytes (from cell lines U937 or THP-1, both obtained from ATCC) or Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs obtained from healthy donors) were added to the medium during or after initial carotid calcification. In the preventive model, rat carotid segments were exposed for 5 days to pro-calcifying culture conditions (3.8 mM Pi), alone or in combination with PBMCs (from 50.103/ mL to 100.103/mL). In the curative model, rat carotid segments were exposed for 5 days to pro-calcifying culture conditions (3.8 mM Pi), prior to be cultured for an additional 5 days in combination with PBMCs (from 50.103/ mL to 100.103/mL). Calcium content was assessed at day 5 or 10, respectively. Calcium content has been expressed as percentage of mean calcium concentration ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), assessed when carotid segments were either not exposed or exposed to monocyte cell lines or PBMCs. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

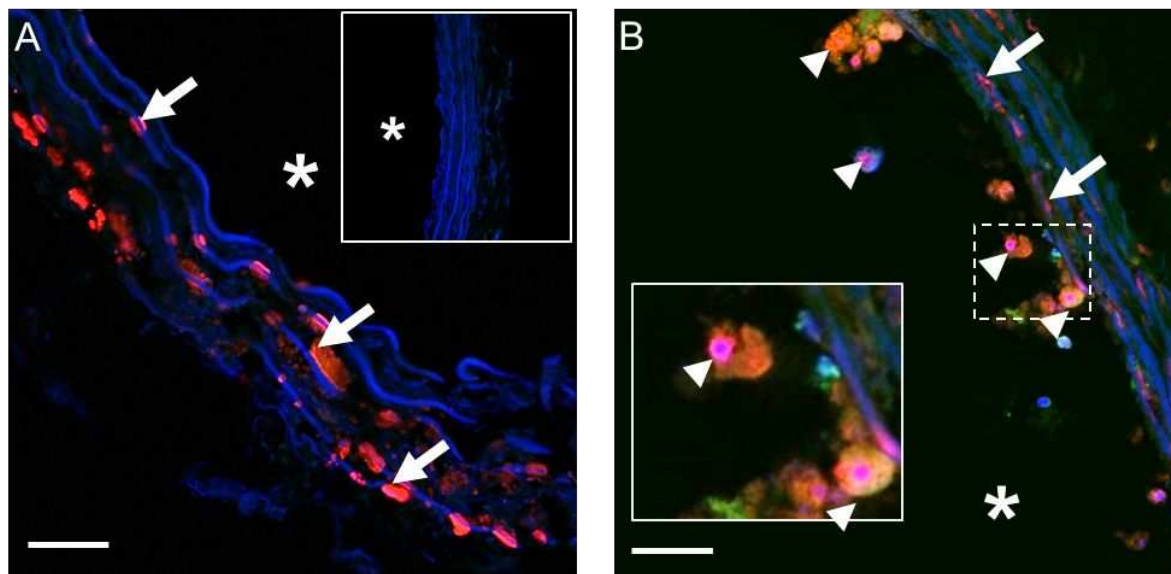


Figure 4

**Fluorescence microscopy localizing vascular calcium deposition and monocyte cells in carotid calcification model.**

Confocal photomicrographs of A) calcified carotid segment (without monocyte addition) stained with Osteosense® 680 EX. Mineral deposition appears as red fluorescent staining (arrows). In the upper right-hand corner a representative photomicrograph shows a carotid artery segment grown for 10 days under non pro-calcifying conditions (0.9 mM Pi) (\* lumen). B) Calcified carotid segment at day 10 of the curative model (with U-937 cells added on day 5) were stained both by Osteosense® 680 EX and PKH26. PKH26 cell membrane pre-staining (green coloration) allows localization of U-937 monocytes (arrow heads) in the vessel lumen (\*) while Osteosense® shows calcium both in the monocytes and in the vessels (arrows). The lower-left hand corner shows a zoom (x2) on adherent monocyte. Scale bars: 100  $\mu$ m.

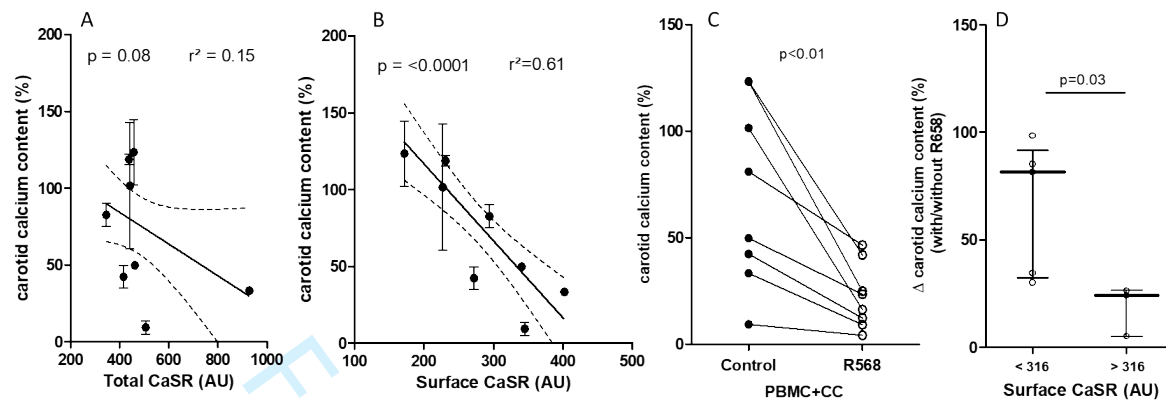
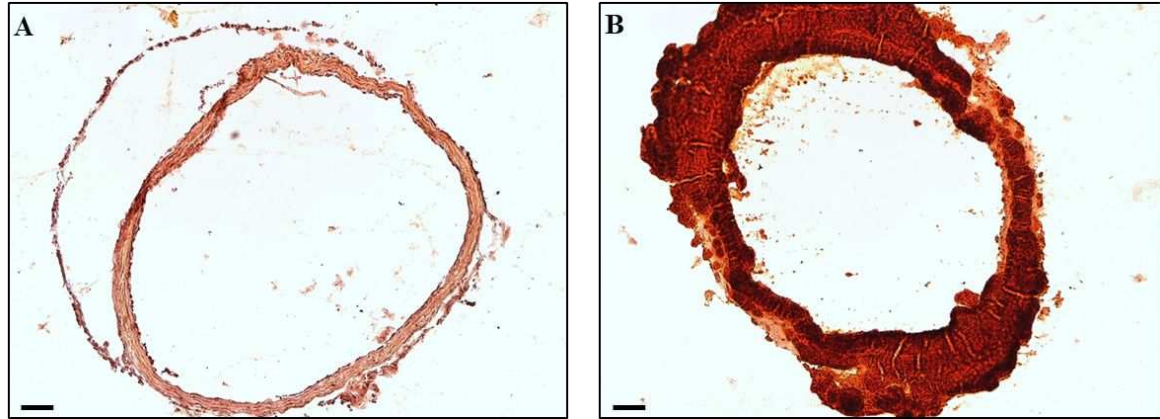


Figure 5

**Impact of decreased monocyte CaSR expression on CKD-associated reduction of PBMCs' ability to inhibit vascular calcification (n=8).**

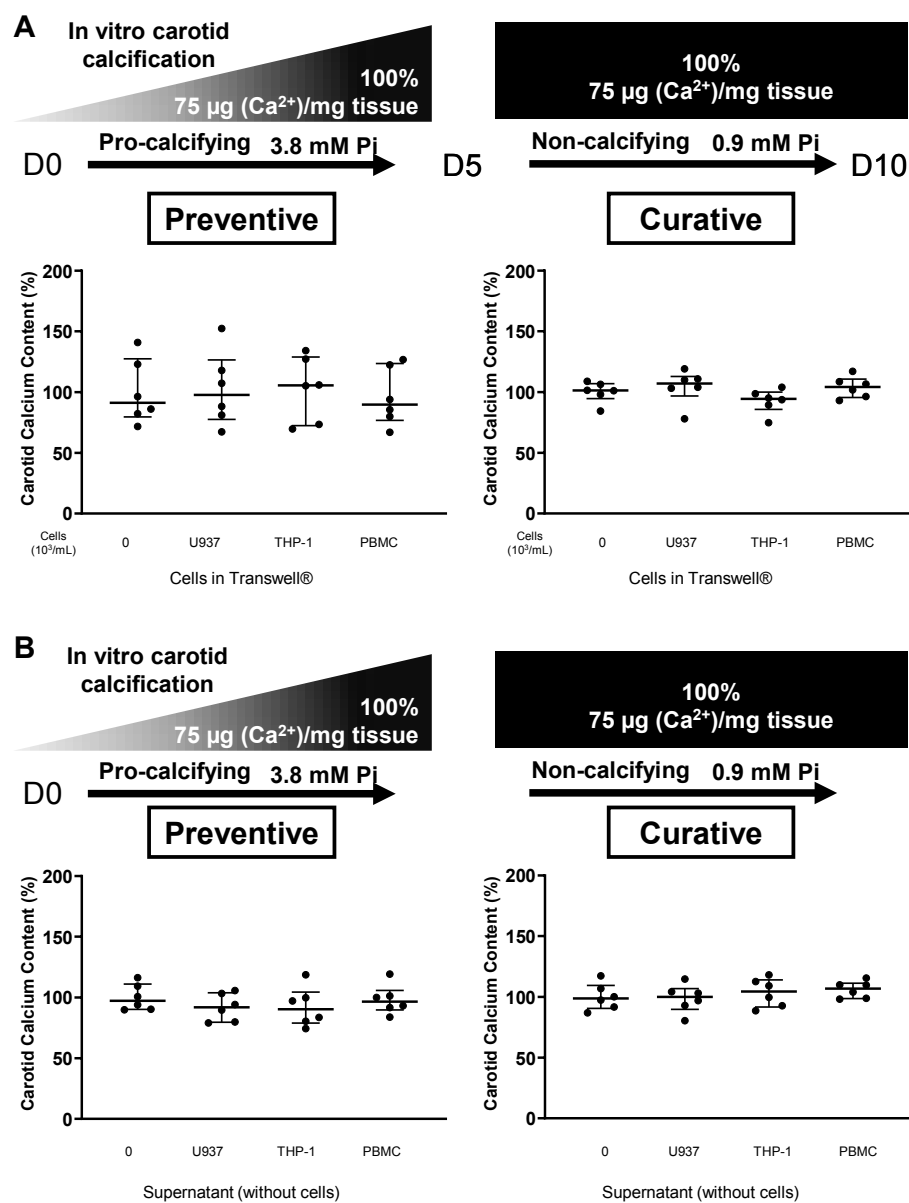
PBMCs from 8 patients with CKD were added to carotid segments *in vitro* in curative model. Carotid tissue calcium content was expressed as percentage of mean calcium concentration ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) assessed when carotid segments were not exposed to PBMCs. A) Carotid calcium content was correlated with monocyte total CaSR expression. B) Carotid calcium content was correlated with monocyte surface CaSR expression. C) Carotid calcium content in absence or presence of NPS-R568 pre-treatment was matched according to each donor to specifically visualize the NPS-R568 effect. D) Differences in carotid calcium content in absence or presence of NPS-R568 pre-treatment were compared between monocytes with low or sufficient CaSR expression (<316 AU and >316 AU respectively). AU: arbitrary unit. CC: calcified carotid.



Supplemental Figure 1

### Red alizarin of the Carotid calcification model (day 5)

Alizarin red staining of two sections of a carotid artery after 5 days of culture in (A) a non-calcifying medium (0.9 mM Pi) or (B) in a pro-calcifying medium (3.8 mM Pi). Calcium quantification by red alizarin gave a mean value of 75  $\mu\text{g}$  of calcium by mg of tissue. Scale bars: 100 $\mu\text{m}$ .



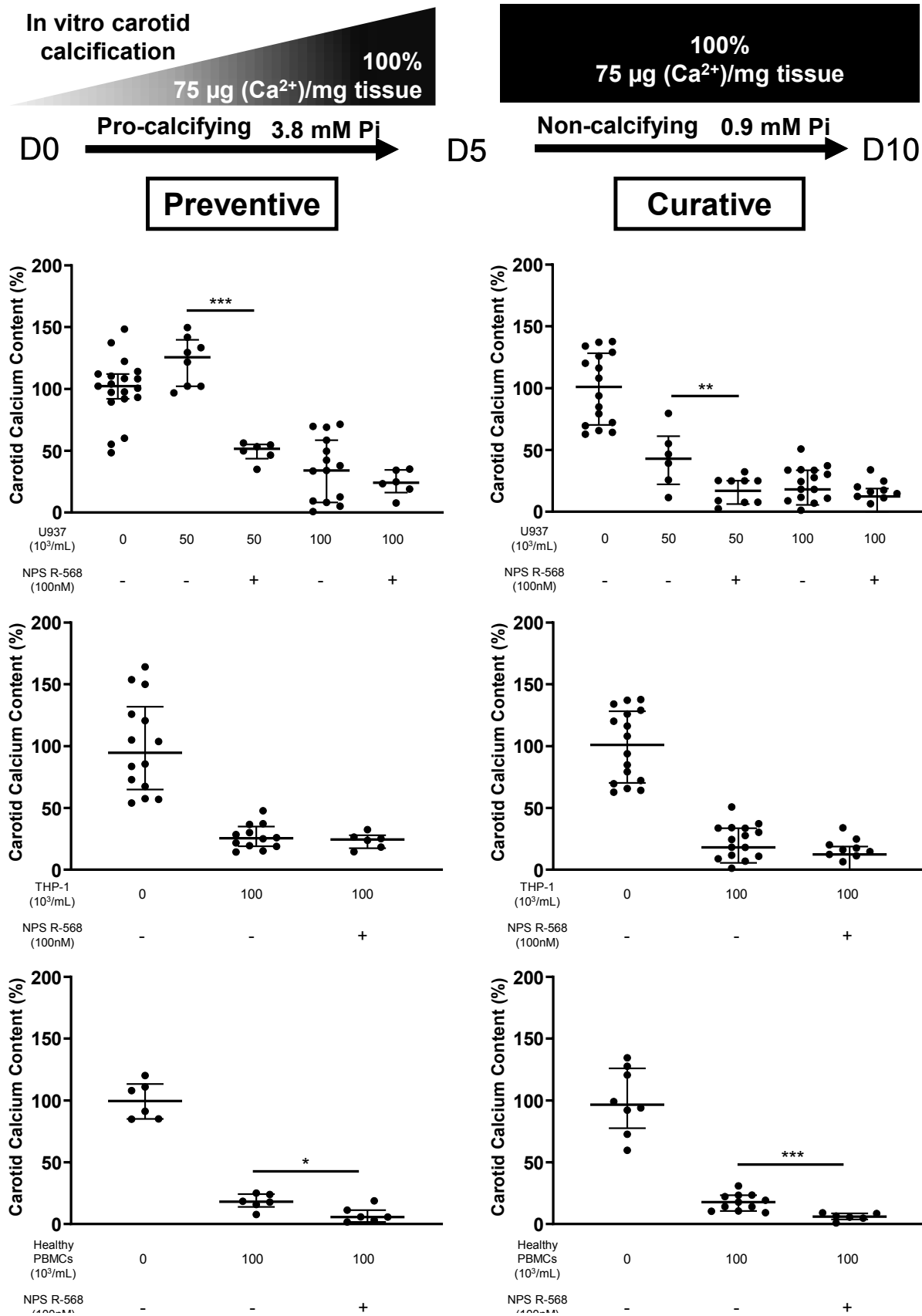
Supplemental Figure 2

**Physical contact of monocytes and PBMCs with calcium deposits needed for anti-calcifying action.**

1  
2  
3 In the preventive and curative models, carotid segments were exposed for 5 days to cells  
4 separated from carotid tissue by a transwell membrane (A) or to supernatant produced by the  
5 respective cell types (B). Calcium content has been expressed as percentage of mean calcium  
6 concentration ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) assessed when carotids were not exposed to either monocyte cell lines  
7 or PBMCs. P values, all  $> 0.05$ .  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review Only

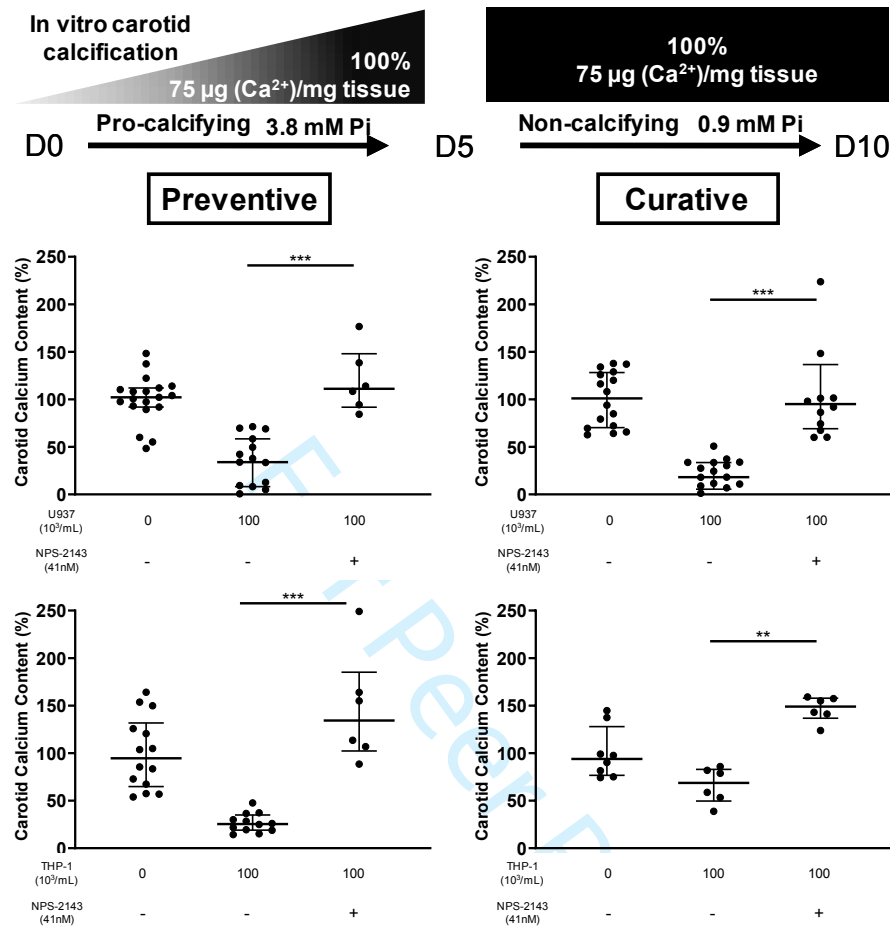




Supplemental Figure 3

1  
2  
3 **Increase by CaSR allosteric activator NPS-R568 of monocyte and PBMC capacity to**  
4  
5 **reduce carotid calcium content**  
6  
7

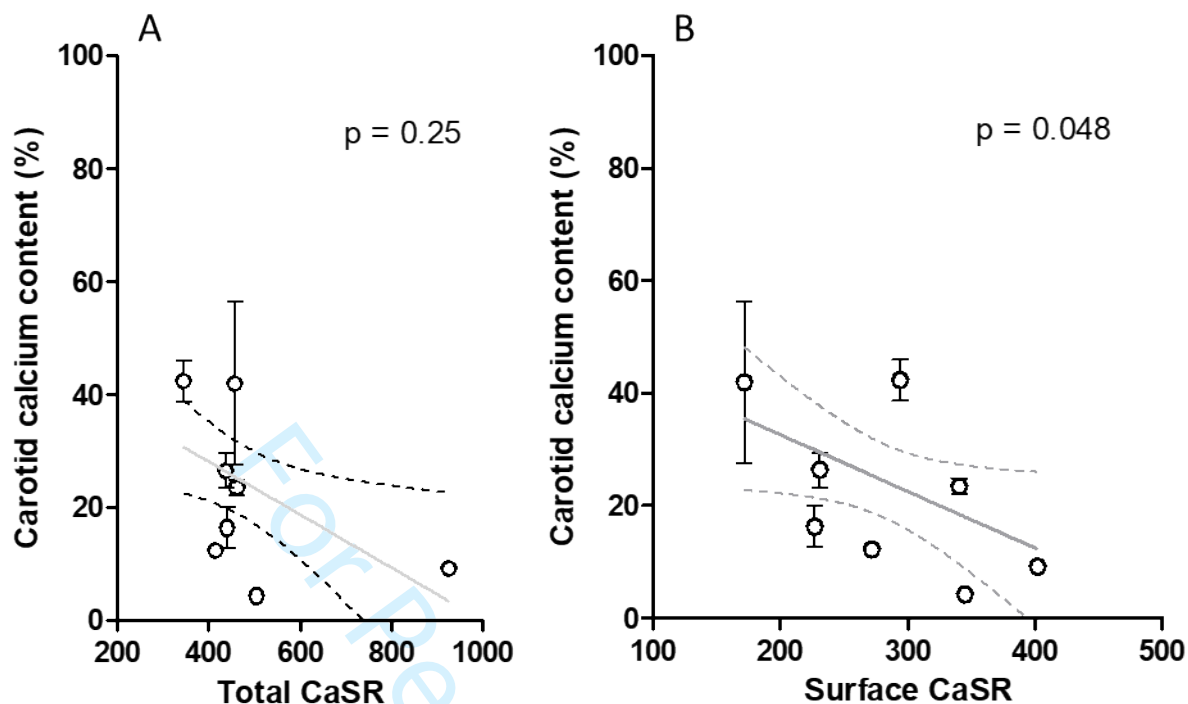
8 In the preventive and curative models, carotid segments were exposed for 5 days to  
9  
10 monocytic cells either pre-treated or not pre-treated with calcimimetic NPS-R568 at 100 nM.  
11  
12 In order to avoid a direct effect of this compound on the carotid segments, the cells were  
13  
14 centrifuged and rinsed twice with a virgin culture medium before their contact with the  
15  
16 carotid tissue. Cells which were not pre-treated with calcimimetic were handled similarly.  
17  
18 Calcium content was assessed at day 5 or 10, respectively. Calcium content has been  
19  
20 expressed as the percentage of mean calcium concentration ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) assessed when carotid  
21  
22 segments were not exposed to either monocytes cell lines or PBMCs. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and  
23  
24 \*\*\* $p < 0.001$ .  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Supplemental Figure 4

### Decrease by CaSR allosteric inhibitor NPS-2143 of monocyte capacity to reduce carotid calcium content.

In the preventive and curative models, carotid segments were exposed for 5 days to cells either pre-treated or not pre-treated with calcilytic NPS-2143 at 41 nM. In order to avoid a direct effect of this compound on carotid tissue, the cells were centrifuged and rinsed twice with a virgin culture medium before their contact with the carotid segments. Cells which were not pre-treated with calcilytic were handled similarly. Calcium content was assessed at day 5 or 10, respectively. Calcium content has been expressed as the percentage of mean calcium concentration ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) assessed when carotid segments were not exposed U937 ou THP-1 cells. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .



Supplemental Figure 5

**Impact of the CKD-associated decrease in monocyte CaSR expression on PBMCs' ability to reduce carotid calcification after calcimimetic pretreatment.**

PBMCs from 8 patients with CKD were pretreated by calcimimetic NPS-R568 and rinsed twice before their contact with carotid segments in curative experimental model. Calcium content was expressed as the percentage of mean calcium concentration ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) assessed when carotid segments were not exposed to PBMC. A) Carotid calcium content was not correlated with monocyte total CaSR expression before calcimimetic exposure. B) Carotid calcium content was correlated with monocyte surface CaSR expression before calcimimetic exposure.

Nos résultats démontrent pour la première fois que, comme dans les tissus parathyroïdiens et vasculaires<sup>191</sup>, l'IRC induit une diminution de l'expression du CaSR des monocytes sanguins. L'expression du CaSR total et membranaire diminue avec le degré de gravité de l'IRC. En outre, l'expression du CaSR total est diminuée après l'exposition des monocytes à du sérum urémique suggérant un rôle d'un ou plusieurs composés circulants dans les cas d'IRC, notamment les toxines urémiques. Le fait que l'expression du CaSR membranaire soit indépendamment associée à l'expression totale du CaSR lors de l'IRC suggère que le processus d'adressage du CaSR vers la membrane plasmique dans les monocytes isolés de patients IRC est modifiée<sup>192</sup> par rapport aux monocytes isolés d'individus sains. Des études supplémentaires devront être réalisées afin de conforter ou d'infirmer cette hypothèse.

Plus l'IRC progresse, plus la mortalité cardiovasculaire est importante<sup>66</sup>. Ce risque accru de mortalité est associé à différents facteurs tels que le développement d'une dysfonction vasculaire<sup>193-195</sup> associé à la présence de CV<sup>38,196</sup>, mais également l'augmentation des concentrations de toxines urémiques<sup>197</sup> ou la présence d'un état pro-inflammatoire<sup>198,199</sup>. Nous avons été capables de démontrer dans des expériences *in vitro* que des monocytes sont capables, et ce de manière concentration-dépendante, d'empêcher le dépôt de calcium mais également de résorber les dépôts déjà formés. Cette capacité à réduire la CV est modulée par l'expression du CaSR et nécessitait un contact cellulaire avec la calcification. De plus, la diminution de l'expression membranaire du CaSR est corrélée à la perte de la capacité des monocytes à « résorber » ces calcifications. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse qu'une diminution de l'expression du CaSR favorise la CV lors de l'IRC.

L'utilisation du calcimimétique NPS-R568 a permis d'améliorer la capacité des PBMC isolés de patients atteints d'IRC à prendre en charge les calcifications. Ces résultats sont en accord avec des données issues des études ADVANCE<sup>200</sup> et surtout d'une étude post-hoc réalisée sur les données de l'étude ADVANCE<sup>201</sup>, qui démontrait que la prise de calcimimétique chez des patients atteint d'IRC était capable de réduire significativement la progression de la CV par rapport à celle observée chez des patients qui n'avaient pas reçu ce traitement. Dans ce contexte, nos résultats permettent de dire que l'expression du CaSR des monocytes pourrait représenter une cible thérapeutique potentielle dans la prise en charge des calcifications liées à l'IRC.

Nos travaux ont permis d'apporter des arguments supplémentaires aux résultats du Dr Mary. En complément des résultats obtenus sur la cohorte de patients atteints d'IRC, nous avons

démontré de manière *in vitro* que la diminution d'expression du CaSR des monocytes était liée à la capacité de prise en charge des calcifications que l'on observe chez ces patients. De plus, l'utilisation d'agents pharmacologiques (calcimimétiques) a permis aux monocytes de recouvrer leur capacité à prendre en charge les calcifications *in vitro*. L'utilisation des activateurs du CaSR chez les patients atteints d'IRC pourrait permettre (1) de pallier la diminution d'expression du CaSR des monocytes et (2) de réduire et de prendre en charge les calcifications présentes chez cette population de patients. Des travaux supplémentaires seront nécessaires afin de préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans cette prise en charge.

# **Discussion**

L'objectif de notre travail était d'une part de préciser le rôle des monocytes dans la prise en charge des CV et d'autre part de préciser le rôle du CaSR dans ces phénomènes. Pour répondre à cet objectif nous avons utilisé deux modèles d'études de calcification à partir de carotides de rats. Un modèle « Préventif » démontrant le rôle des monocytes dans la phase de développement des CV et un modèle « Curatif » mettant en évidence la capacité des monocytes à prendre en charge des CV déjà formées. Dans nos modèles, les segments carotidiens ont été cultivés en présence de 3,8mM de phosphate inorganique afin d'induire leur calcification. Cette calcification, mise en évidence par coloration au rouge d'Alizarine et par l'agent fluorescent OsteoSense® 680 EX, se traduit par un dépôt de cristaux d'hydroxyapatite principalement au niveau de la média mais également dans l'intima du segment carotidien. Ces résultats ont été confortés par le dosage du calcium présent dans les carotides qui a démontré une augmentation significative du calcium synonyme de calcification au sein du vaisseau. Une étude récente utilisant un modèle de calcification similaire au notre a permis de mettre en évidence que l'exposition à de fortes concentrations en phosphate inorganique augmente la calcification médiale du vaisseau<sup>202</sup>. Cette étude a également permis d'observer par spectroscopie IRTF (InfraRouge à Transformée de Fourier) que la calcification est composée de cristaux d'hydroxyapatite contenant du calcium et du phosphate. Ces cristaux d'hydroxyapatite sont hautement insolubles dans des conditions physiologiques et seul un processus cellulaire actif permettrait une régression des calcifications.

Les données que nous avons recueillies indiquent que l'exposition des segments carotidiens à différents types de monocytes humains (U937, THP-1) ou à des PBMC entraîne une réduction significative des calcifications présentes dans ces vaisseaux, par rapport à ce qui est observé lorsque ces derniers ne sont pas mis en contact avec les cellules. De manière similaire, l'exposition des segments carotidiens calcifiés aux monocytes humains U937 et PBMC a permis une diminution significative des calcifications, dans le modèle « Curatif ». Ce phénomène n'a cependant pas été constaté lorsque dans le modèle « Curatif » les carotides précalcifiées étaient exposées à des monocytes de type THP-1. Plusieurs facteurs comme l'origine tissulaire, la capacité de liaison aux tissus calcifiés mais aussi la capacité à se différencier en macrophages peuvent expliquer les différences observées entre les types de monocytes utilisés dans notre travail. De plus, les différences observées entre les types de monocytes pourraient s'expliquer par l'existence des différentes sous-populations monocytaires (classique, intermédiaire et non-classique). Il serait intéressant d'isoler une sous-



population de monocytes capable de se lier et d'internaliser les calcifications et par la suite de déterminer si les monocytes se différencient en un autre type cellulaire (macrophage, ostéoclaste).

### **Prise en charge des CV par les monocytes**

La prise en charge des CV par les monocytes nécessite un contact avec le tissu vasculaire. Nous avons mis en évidence, à l'aide de Transwell®, que les monocytes étaient inefficaces pour réduire la calcification des carotides lorsqu'ils sont physiquement séparés des segments carotidiens. Nous avons également démontré que des surnageants de culture dépourvus de cellules issus de nos modèles « Préventif » et « Curatif » n'ont pas permis d'observer de diminution des CV. Ces résultats indiquent que la prise en charge des calcifications par les monocytes n'est pas liée à une substance (cytokine, matrikine...) potentiellement sécrétée par les monocytes. Les résultats obtenus sans monocytes humains démontrent également que la probable présence initiale de monocytes de rats dans le segment carotidien n'est pas suffisante pour empêcher ou limiter la formation des CV. Les images obtenues par microscopie confocale confirment notre hypothèse par la présence de cristaux d'hydroxyapatite à l'intérieur des monocytes U937 (Figure 4 de l'article). L'action des monocytes permet une prise en charge des CV et nous permet de dire que le phénomène observé est un processus cellulaire actif. Plusieurs études démontrent que le remodelage des CV repose sur un contact cellule-cellule entre les monocytes et les CMLV<sup>203-205</sup>. L'hypothèse étant que les CMLV qui se différencient en cellules de phénotype ostéo-chondrocytaire, lors de la mise en place des CV, deviennent capables de sécréter des facteurs de différenciation ostéoclastique tels que le RANKL ou le M-CSF. Ces facteurs de différenciation peuvent agir sur les monocytes présents dans la paroi vasculaire favorisant leur différenciation en macrophages ou en ostéoclastes<sup>206</sup>. De plus, il a été démontré que des ostéoclastes matures étaient capables de diminuer le contenu minéral d'une aorte calcifiée<sup>207</sup>. La différenciation des monocytes en ostéoclastes pourrait alors laisser penser que la prise en charge des calcifications observées dans nos modèles serait similaire à la résorption osseuse. La résorption osseuse impliquant l'anhydrase carbonique de type II (CA II), enzyme responsable de la dégradation de l'hydroxyapatite, et qui est exprimé par les monocytes/macrophages observés dans les zones entourant les CV<sup>208</sup>, il serait alors intéressant

de suivre, par immunomarquages, l'expression intracellulaire de cette enzyme dans nos modèles.

L'hétérogénéité des monocytes/macrophages joue également un rôle important dans la régression des CV. Il a été démontré que la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 s'accompagne d'une inhibition de la CV due à une production réduite de médiateurs pro-inflammatoires associée à une augmentation de la concentration locale d'inhibiteurs de calcification, comme le PPI. Villa-Bellosta *et al.* ont démontré que les macrophages M2 en co-culture avec des CMLV prévenaient les dépôts de minéral. Cette activité anti-calcifiante est principalement due à une accumulation extracellulaire d'ATP et de PPI dans les macrophages M2, effet non observé avec les macrophages M1<sup>209</sup>. A l'avenir il serait intéressant de déterminer si les monocytes utilisés dans nos modèles se différencient en macrophages ou en ostéoclastes. Par ailleurs, les différences observées entre les lignées monocytaires dans leur capacité à prendre en charge les CV pourrait être liée à leur capacité à se différencier en macrophage ou ostéoclaste. L'utilisation de marqueurs spécifiques aux macrophages (CD68) ou aux ostéoclastes (RANK), ou de l'activité ostéoclastique (CA II, TRAP) permettraient de définir si les monocytes de nos modèles se différencient afin de prendre en charge les calcifications.

### **Modulation de la capacité à prendre en charge les CV en fonction de l'activité du CaSR**

La prise en charge des calcifications nécessite une migration des monocytes vers la zone calcifiée. Le CaSR, présent sur les monocytes, a été prouvé comme étant impliqué dans la migration des monocytes/macrophages vers des zones riches en calcium<sup>2,4</sup>. Dans les pathologies associées au développement des CV, comme l'IRC ou l'athérosclérose, il a été démontré une diminution significative de l'expression du CaSR<sup>179,180</sup>. Tout en reproduisant d'une certaine manière la réduction d'expression constatée chez les patients atteints de ces pathologies nous avons voulu déterminer si la modulation de la sensibilité du CaSR des monocytes au calcium était impliquée dans leur capacité de prise en charge des CV. Pour cela nous avons utilisé un composé de la classe pharmacologique des calcilytiques, le NPS-2143. Lors de notre travail, la pré-incubation des monocytes avec le NPS-2143 est très fortement corrélée à une perte de capacité des monocytes à prendre en charge la calcification. Ce phénomène a été observé dans les modèles « Préventif » et « Curatif » avec les lignées

monocytaires U937 et THP-1. Dans les deux cas, l'inhibition du CaSR n'est pas associée à une prise en charge du contenu calcique présent dans la carotide. D'un point de vue pratique, l'utilisation du calcilytique ne semble pas avoir d'intérêt thérapeutique à la prise en charge des CV<sup>185</sup>. Par contre *in vitro* il représente un intérêt fonctionnel, à savoir la capacité de réduire la sensibilité du CaSR envers le calcium. D'un point de vue pharmacologique, l'utilisation de ces composés permet de démontrer l'implication du CaSR dans les phénomènes biologiques observés. A l'inverse, l'utilisation de composés de la classe pharmacologique des calcimimétiques, tel que le NPS-R568, accroît la sensibilité du CaSR au calcium ce qui conduit à une augmentation des réponses biologiques qui résultent de l'activation de ce dernier. L'utilisation simultanée de ces deux agents pharmacologiques nous a permis d'impliquer la stimulation du CaSR dans les phénomènes biologiques sur lesquels nous travaillons. Ainsi, la pré-incubation des monocytes avec le calcimimétique NPS-R568 a permis d'observer des résultats très prometteurs concernant la prise en charge des calcifications de manière « Préventive » et « Curative ». La pré-incubation de  $50.10^3$  U937 avec le NPS-R568 [100nM], a permis une diminution des CV que nous n'observions pas sans le calcimimétique. De façon plus intéressante, l'exposition des PBMC au calcimimétique a permis une prise en charge plus importante que sans calcimimétique. Le calcimimétique a favorisé la prise en charge des CV, effet auquel le calcilytique s'était opposé. Ensemble, ces données démontrent l'implication du CaSR dans le phénomène biologique sur lequel nous travaillons *in vitro*. L'utilisation *in vivo* des calcimimétiques dans des modèles animaux de calcification a également permis d'observer une diminution du développement des CV sans préciser le rôle des monocytes dans ce phénomène<sup>181,184</sup>. Dans notre travail, l'ajout de calcimimétique a également amélioré la prise en charge des CV par des PBMC provenant de patients sains et de patients atteints d'IRC, suggérant un potentiel effet bénéfique en clinique. L'étude des résultats obtenus avec ces deux types de PBMC permet de mieux appréhender le rôle des monocytes dans ces effets « décalcifiants vasculaires » et de préciser le rôle du CaSR dans ce processus.

Plusieurs études ont déjà démontré l'effet protecteur du calcimimétique en condition calcifiante. Ainsi des données antérieures provenant de notre laboratoire ont montré que les souris apoE -/- atteintes d'IRC traitées par calcimimétique présentaient une diminution significative de la surface de la CV et de la lésion athéroscléreuse<sup>181</sup>. Une autre étude a démontré que le NPS-R568 augmentait la biosynthèse et l'activation du CaSR des CMLV humaines et permettait une diminution du dépôt calcique<sup>1</sup>. Plus récemment, l'utilisation de l'Etelcalcetide, un nouvel

agoniste du CaSR, a permis d'inhiber le développement de calcifications dans un modèle de rats insuffisants rénaux<sup>210</sup>. L'activation du CaSR monocytaire est également connue pour exercer des effets anti-inflammatoires en changeant le phénotype des macrophages en macrophages anti-inflammatoires M2<sup>211</sup>. Au-delà de la réduction de la prise en charge de la calcification, la diminution de l'expression du CaSR des monocytes peut entraîner une perte de leur capacité sentinelle qui contribuerait à la mise en place d'une dysfonction de ces cellules propice au développement des CV. En effet, les monocytes font partie de la première ligne de défense de l'organisme et, en réponse à un stimulus inflammatoire, ils possèdent cette capacité de migrer à travers la membrane endothéliale<sup>102</sup>. La perte de cette fonction de sentinelle et de migration entraînerait une altération de la défense de l'organisme. On pourrait alors en déduire que la diminution du CaSR monocytaire entraînerait une perte de leur capacité de sentinelle envers le calcium et favoriserait le développement de CV chez les patients. L'utilisation d'agents pharmacologiques de type calcimimétique pourrait être une voie thérapeutique permettant d'inhiber le développement des CV au travers d'une action exercée directement sur les monocytes.

### **Limites et perspectives de nos modèles**

La première limite de notre modèle est la probable réaction inter-espèce entre les monocytes humains et la carotide de rat qui n'a pas été étudiée dans ce travail. Il serait intéressant d'utiliser des monocytes de rats ou une artère humaine afin de préciser si nous obtenons les mêmes résultats que ceux décrits dans ce travail. Les résultats de notre étude, que ce soit concernant la prise en charge de manière préventive ou curative, sont basés sur des modèles *in vitro*. Il serait intéressant de réaliser des études complémentaires *in vivo* en utilisant un modèle animal présentant des calcifications et en utilisant des monocytes pré-incubés au calcimimétique. Les résultats de ces études permettraient de connaître le devenir de ces monocytes, vont-ils migrer et résorber les calcifications? La suite de ce projet consistera à étudier par quel(s) mécanisme(s) les monocytes agissent sur la calcification et s'ils peuvent cibler les zones calcifiées pour améliorer les résultats cliniques chez les patients atteints de CV. Cet objectif soulève plusieurs questions complexes. Peut-on stimuler des monocytes/macrophages sans agir simultanément sur les cellules qui contribuent à la calcification cardiovasculaire? Peut-on induire une activité ostéoclastique sans perdre le rôle bénéfique des macrophages dans l'inflammation tout en

limitant les fonctions non désirées des macrophages dans les lésions athérosclérotiques? La stimulation de l'ostéoclastogenèse au niveau vasculaire peut-elle être réalisée de manière à éviter des désordres dans le remodelage osseux sur le long terme? La régression des CV peut-elle être examinée *in vivo* et de manière non-invasive? En effet nous avons observé que les CV peuvent être facilement observées dans plusieurs tissus par des méthodes histologiques (rouge d'Alizarine, Von Kossa), ainsi que par microscopie confocale (OsteoSense® 680 EX). Cependant nous sommes actuellement limités dans la détection non invasive des calcifications *in vivo*<sup>212</sup>. Les rayons X, les ultrasons, la fluoroscopie et la tomodensitométrie permettent d'identifier une CV à un stade avancé. L'observation des microcalcifications précoces est quant à elle limitée<sup>213</sup>. Une méthode prometteuse pour visualiser les microcalcifications en plus d'une calcification avancée est la tomographie par émission de positons en association avec le <sup>18</sup>F-fluoride qui se lie aux cristaux d'hydroxyapatite en croissance<sup>214</sup>. Des travaux supplémentaires sont toutefois nécessaires pour valider la spécificité obtenue par cette méthode d'imagerie.

# **Conclusion**

Les CV sont fréquentes dans la population générale et entraînent l'apparition de complications au niveau vasculaire dont les conséquences correspondent à une augmentation de la mortalité cardiovasculaire. A côté de son rôle central dans la régulation de la calcémie, le CaSR est impliqué dans de nombreux phénomènes biologiques comme le contrôle du remodelage osseux ou la survenue et le développement des CV. Notre équipe de recherche a notamment démontré que la stimulation du CaSR est associée à un effet direct sur les cellules musculaires lisses en inhibant le processus de minéralisation. L'expression du CaSR, sa stimulation par le calcium (sous forme complexée ou non) et/ou par un calcimimétique protégeraient les patients du développement et de la progression des CV. Dans ce contexte physiopathologique, le monocyte - connu pour sa capacité à se différencier en ostéoclaste ou en macrophage - pourrait être le chaînon manquant au remodelage des CV.

Dans ce travail nous démontrons que les monocytes et le CaSR sont impliqués dans la prise en charge des CV. L'utilisation de deux modèles de minéralisation *in vitro* de carotide de rats a permis de démontrer que les monocytes étaient capables de prendre en charge les CV lors de leur développement (modèle « Préventif ») mais également lorsque les CV sont déjà présentes dans le vaisseau (modèle « Curatif »). L'utilisation d'outils d'imagerie cellulaire et de cytométrie en flux a permis de mettre en évidence une internalisation du minéral par les monocytes. Par ailleurs, la stimulation du CaSR présent sur les monocytes par le calcimimétique NPS-R568 permet une régression plus importante des calcifications. Ces données indiquent que la stimulation du CaSR monocyttaire jouerait un rôle protecteur face au développement des calcifications. A l'avenir, l'utilisation du calcimimétique sur les monocytes de patients pourrait faire l'objet d'un traitement thérapeutique pour lutter contre les CV qui ne bénéficient aujourd'hui d'aucun traitement.

**Publications, présentations orales et**  
**affichées**



## **Publication scientifiques**

**Association of decreased monocyte CaSR expression in chronic kidney disease patients with impaired monocyte ability to reduce vascular calcification.**

*Kidney International (en révision), 2020.*

T. OBJOIS, A. MARY, M. BRAZIER, Y. BENNIS, C. BOUDOT, G. LENGLET, J. PACCOU, J.M. BUGNICOURT, G. CHOUKROUN, T. DRUEKE, Z. MASSY, S. KAMEL, I. SIX, R. MENTAVERRI

**The metabolism of epoxyeicosatrienoic acids by soluble epoxide hydrolase is protective against the development of vascular calcification.**

*International Journal of Molecular Sciences, 2020.*

O. VARENNES, R. MENTAVERRI, T. DUFLOT, G. KAUFFENSTEIN, T. OBJOIS, G. LENGLET, C. AVONDO, S. LOUHICHI, C. MORISSEAU, M. BRAZIER, S. KAMEL, I. SIX, J. BELLIN

**Expression of the calcium-sensing receptor in monocytes from synovial fluid is increased in osteoarthritis.**

*Joint, Bone, Spine: revue du rhumatisme, 2016.*

A. SEJOURNE, C. BOUDOT, T. OBJOIS, P. FARDELLONE, M. BRAZIER, I. SIX, S. KAMEL, R. MENTAVERRI, V. GOËB

**Les moisissures dans l'habitat picard : caractérisation de la contamination et évaluation des risques sanitaires.**

*Journal de mycologie médicale, 2014.*

S. LE GAL, M. DEFFONTAINE, C. DAMIANI, T. OBJOIS, A. SAUVAGE, S. TAILLAIN, B. BENABES, E. POPIN, G. NEVEZ, A. TOTET

## **Communications affichées**

**Role of monocytes in the treatment of vascular calcifications: involvement of the calcium-sensing receptor (CaSR).**

*Congrès de l'American Heart Association, Philadelphie (USA), 2019.*

T. OBJOIS, A. SEJOURNE, M. BRAZIER, C. BOUDOT, S. KAMEL, I. SIX, R. MENTAVERRI

**Rôle des monocytes dans la prise en charge des calcifications vasculaires : implication du récepteur sensible au calcium (CaSR).**

*Journée Scientifique de la FHU REMOD, Rouen, 2019.*

T. OBJOIS, A. SEJOURNE, M. BRAZIER, C. BOUDOT, S. KAMEL, I. SIX, R. MENTAVERRI

**Involvement of calcium-sensing receptor in monocyte toward osteoarthritic synovial fluid.**

*Journée des Jeunes Chercheurs SFR CAP Santé, Amiens, 2016.*

T. OBJOIS, A. SEJOURNE, C. BOUDOT, P. FARDELLONE, M. BRAZIER, S. KAMEL, I. SIX, V. GOEB, R. MENTAVERRI

**Communications orales**

**Rôle des monocytes dans la prise en charge des calcifications vasculaires : implication du récepteur sensible au calcium (CaSR).**

*Journée Scientifique de la FHU REMOD, Rouen, 2019.*

T. OBJOIS, A. SEJOURNE, M. BRAZIER, C. BOUDOT, S. KAMEL, I. SIX, R. MENTAVERRI

**Role of monocytes in the treatment of vascular calcifications: involvement of the calcium-sensing receptor (CaSR).**

*Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés, Monaco, Mars 2018.*

T. OBJOIS, A. SEJOURNE, M. BRAZIER, C. BOUDOT, S. KAMEL, I. SIX, R. MENTAVERRI

**Prix de communication orale**

**Rôle des monocytes dans la prise en charge des calcifications vasculaires : implication du récepteur sensible au calcium (CaSR).**

*Journée Scientifique de la FHU REMOD, Rouen, 2019.* Prix Travel Award décerné par la Fédération Hospitalo-Universitaire STOP-AS autour du rétrécissement aortique.

# **Bibliographie**

1. Hénaut, L. *et al.* Calcimimetics increase CaSR expression and reduce mineralization in vascular smooth muscle cells: mechanisms of action. *Cardiovasc. Res.* **101**, 256–265 (2014).
2. Paccou, J. *et al.* Total calcium-sensing receptor expression in circulating monocytes is increased in rheumatoid arthritis patients with severe coronary artery calcification. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 412–421 (2014).
3. Yamaguchi, T. *et al.* Expression of Extracellular Calcium (Ca<sup>2+</sup>)-Sensing Receptor in Human Peripheral Blood Monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 501–506 (1998).
4. Olszak, I. T. *et al.* Extracellular calcium elicits a chemokinetic response from monocytes in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* **105**, 1299–1305 (2000).
5. Qiao, J.-H., Mertens, R. B., Fishbein, M. C. & Geller, S. A. Cartilaginous metaplasia in calcified diabetic peripheral vascular disease: Morphologic evidence of enchondral ossification. *Hum. Pathol.* **34**, 402–407 (2003).
6. Les 10 principales causes de mortalité. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
7. Rennenberg, R. J. M. W. *et al.* Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: A meta-analysis. *Vasc. Health Risk Manag.* **5**, 185–197 (2009).
8. Allison, M. A., Criqui, M. H. & Wright, C. M. Patterns and risk factors for systemic calcified atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 331–336 (2004).
9. Demer, L. L. & Tintut, Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* **117**, 2938–2948 (2008).
10. Budoff, M. J. *et al.* Long-Term Prognosis Associated With Coronary Calcification: Observations From a Registry of 25,253 Patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 1860–1870 (2007).
11. Vliementhart Rozemarijn *et al.* Coronary Calcification Improves Cardiovascular Risk Prediction in the Elderly. *Circulation* **112**, 572–577 (2005).
12. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233–241 (2000).

13. Zeiher, A. M., Schächinger, V. & Minners, J. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation* **92**, 1094–1100 (1995).
14. Chang, Y. *et al.* Metabolically-Healthy Obesity and Coronary Artery Calcification. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 2679–2686 (2014).
15. Aikawa Elena *et al.* Osteogenesis Associates With Inflammation in Early-Stage Atherosclerosis Evaluated by Molecular Imaging In Vivo. *Circulation* **116**, 2841–2850 (2007).
16. Schmermund Axel *et al.* Natural History and Topographic Pattern of Progression of Coronary Calcification in Symptomatic Patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 421–426 (2001).
17. Pohle, K. *et al.* Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation* **104**, 1927–1932 (2001).
18. Bild, D. E. *et al.* Prevalence and correlates of coronary calcification in black and white young adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 852–857 (2001).
19. Zoccali, C., Mallamaci, F. & Tripepi, G. Novel Cardiovascular Risk Factors in End-Stage Renal Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, S77–S80 (2004).
20. Ruiz-Ortega M. *et al.* Role of the Renin-Angiotensin System in Vascular Diseases. *Hypertension* **38**, 1382–1387 (2001).
21. Gibbons, G. H., Pratt, R. E. & Dzau, V. J. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J. Clin. Invest.* **90**, 456–461 (1992).
22. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115–126 (1999).
23. Sakamoto Hironosuke *et al.* Biomechanical Strain Induces Class A Scavenger Receptor Expression in Human Monocyte/Macrophages and THP-1 Cells. *Circulation* **104**, 109–114 (2001).

24. Schmidt, A. M., Yan, S. D., Wautier, J. L. & Stern, D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ. Res.* **84**, 489–497 (1999).
25. Dhingra, R. *et al.* Relations of Serum Phosphorus and Calcium Levels to the Incidence of Cardiovascular Disease in the Community. *Arch. Intern. Med.* **167**, 879–885 (2007).
26. Kestenbaum, B. *et al.* Serum Phosphate Levels and Mortality Risk among People with Chronic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 520–528 (2005).
27. Tonelli Marcello, Sacks Frank, Pfeffer Marc, Gao Zhiwei & Curhan Gary. Relation Between Serum Phosphate Level and Cardiovascular Event Rate in People With Coronary Disease. *Circulation* **112**, 2627–2633 (2005).
28. Pugsley, M. K. & Tabrizchi, R. The vascular system. An overview of structure and function. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **44**, 333–340 (2000).
29. Wagenseil, J. E. & Mecham, R. P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol. Rev.* **89**, 957–989 (2009).
30. Shroff, R., Long, D. A. & Shanahan, C. Mechanistic Insights into Vascular Calcification in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 179–189 (2013).
31. Palioian, N. J. & Giachelli, C. M. A current understanding of vascular calcification in CKD. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **307**, F891-900 (2014).
32. Vattikuti, R. & Towler, D. A. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **286**, E686-696 (2004).
33. Johnson Rebecca C., Leopold Jane A. & Loscalzo Joseph. Vascular Calcification. *Circ. Res.* **99**, 1044–1059 (2006).
34. Nadra, I. *et al.* Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ. Res.* **96**, 1248–1256 (2005).

35. Shanahan, C. M. *et al.* Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* **100**, 2168–2176 (1999).
36. Lanzer, P. *et al.* Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur. Heart J.* **35**, 1515–1525 (2014).
37. Schinke, T., McKee, M. D., Kiviranta, R. & Karsenty, G. Trends in Molecular Medicine: Molecular determinants of arterial calcification. *Ann. Med.* **30**, 538–541 (1998).
38. London, G. M. *et al.* Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **18**, 1731–1740 (2003).
39. Aitken, E., Ramjug, S., Buist, L. & Kingsmore, D. The prognostic significance of iliac vessel calcification in renal transplantation. *Transplant. Proc.* **44**, 2925–2931 (2012).
40. Pawade, T. A., Newby, D. E. & Dweck, M. R. Calcification in Aortic Stenosis: The Skeleton Key. *J. Am. Coll. Cardiol.* **66**, 561–577 (2015).
41. Stewart, B. F. *et al.* Clinical Factors Associated With Calcific Aortic Valve Disease fn1fn1This study was supported in part by Contracts NO1-HC85079 through HC-850086 from the National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. *J. Am. Coll. Cardiol.* **29**, 630–634 (1997).
42. Lindroos, M., Kupari, M., Heikkilä, J. & Tilvis, R. Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: An echocardiographic study of a random population sample. *J. Am. Coll. Cardiol.* **21**, 1220–1225 (1993).
43. Dwyer, K. M., Francis, D. M. A., Hill, P. A. & Murphy, B. F. Calcific uraemic arteriolopathy: local treatment and hyperbaric oxygen therapy. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **17**, 1148–1149 (2002).
44. Rogers, N. M. & Coates, P. T. H. Calcific uraemic arteriolopathy: an update. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **17**, 629–634 (2008).

45. Parker, R. W., Mouton, C. P., Young, D. W. & Espino, D. V. Early recognition and treatment of calciphylaxis. *South. Med. J.* **96**, 53–55 (2003).
46. Dosanjh, A. & Kebebew, E. Calciphylaxis: Rare but Fatal. *Curr. Surg.* **62**, 455–458 (2005).
47. Magro, C. M., Simman, R. & Jackson, S. Calciphylaxis: a review. *J. Am. Coll. Certif. Wound Spec.* **2**, 66–72 (2010).
48. Saifan, C., Saad, M., El-Charabaty, E. & El-Sayegh, S. Warfarin-induced calciphylaxis: a case report and review of literature. *Int. J. Gen. Med.* **6**, 665–669 (2013).
49. Rocha-Singh, K. J., Zeller, T. & Jaff, M. R. Peripheral arterial calcification: Prevalence, mechanism, detection, and clinical implications. *Catheter. Cardiovasc. Interv.* **83**, E212–E220 (2014).
50. Schlieper, G. Vascular calcification in chronic kidney disease: not all arteries are created equal. *Kidney Int.* **85**, 501–503 (2014).
51. Kawai-Kowase, K. & Owens, G. K. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **292**, C59–C69 (2007).
52. Lau, W. L., Festing, M. H. & Giachelli, C. M. Phosphate and Vascular Calcification: Emerging Role of the Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter PiT-1. *Thromb. Haemost.* **104**, 464–470 (2010).
53. Hénaut, L. *et al.* Mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement des calcifications vasculaires. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **73**, 271–287 (2015).
54. Reynolds, J. L. *et al.* Human Vascular Smooth Muscle Cells Undergo Vesicle-Mediated Calcification in Response to Changes in Extracellular Calcium and Phosphate Concentrations: A Potential Mechanism for Accelerated Vascular Calcification in ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 2857–2867 (2004).
55. Hsu, H. H. T. & Camacho, N. P. Isolation of calcifiable vesicles from human atherosclerotic aortas. *Atherosclerosis* **143**, 353–362 (1999).



56. Demer, L. L. & Tintut, Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 715–723 (2014).
57. Kapustin, A. N. & Shanahan, C. M. Calcium Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell-Derived Matrix Vesicles. *Trends Cardiovasc. Med.* **22**, 133–137 (2012).
58. Saliba, W. & El-Haddad, B. Secondary hyperparathyroidism: pathophysiology and treatment. *J. Am. Board Fam. Med. JABFM* **22**, 574–581 (2009).
59. Holick, M. F. Vitamin D and the kidney. *Kidney Int.* **32**, 912–929 (1987).
60. Nabeshima, Y. The discovery of alpha-Klotho and FGF23 unveiled new insight into calcium and phosphate homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **65**, 3218–3230 (2008).
61. Faul, C. *et al.* FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **121**, (2011).
62. Six, I. *et al.* Direct, Acute Effects of Klotho and FGF23 on Vascular Smooth Muscle and Endothelium. *PLOS ONE* **9**, e93423 (2014).
63. Ewence Alexandra E. *et al.* Calcium Phosphate Crystals Induce Cell Death in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* **103**, e28–e34 (2008).
64. Sage, A. P., Lu, J., Tintut, Y. & Demer, L. L. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int.* **79**, 414–422 (2011).
65. Guide parcours de soins maladie rénale chronique. [https://www.has-sante.fr/plugins/ModuleXitiKLEE/types/FileDocument/doXiti.jsp?id=c\\_1241973](https://www.has-sante.fr/plugins/ModuleXitiKLEE/types/FileDocument/doXiti.jsp?id=c_1241973).
66. Go, A. S., Chertow, G. M., Fan, D., McCulloch, C. E. & Hsu, C. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1296–1305 (2004).
67. Goodman, W. G. *et al.* Coronary-Artery Calcification in Young Adults with End-Stage Renal Disease Who Are Undergoing Dialysis. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1478–1483 (2000).

68. Block, G., Hulbert-Shearon, T., Levin, N. & Port, F. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study. *Am. J. Kidney Dis.* **31**, 607–617 (1998).
69. Fogg, D. K. *et al.* A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science* **311**, 83–87 (2006).
70. Bar-Shavit, Z. The osteoclast: A multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J. Cell. Biochem.* **102**, 1130–1139 (2007).
71. Mosser, D. M. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* **73**, 209–212 (2003).
72. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
73. Passlick, B., Flieger, D. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**, 2527–2534 (1989).
74. Ziegler-Heitbrock, H. W. L. *et al.* Small (CD14+/CD16+) Monocytes and Regular Monocytes in Human Blood. *Pathobiology* **59**, 127–130 (1991).
75. Ziegler-Heitbrock, H. W. L. *et al.* The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2053–2058 (1993).
76. Fingerle, G. *et al.* The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* **82**, 3170–3176 (1993).
77. Ancuta, P. *et al.* Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16+ Monocytes. *J. Exp. Med.* **197**, 1701–1707 (2003).
78. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74–e80 (2010).
79. Pardali, E. & Waltenberger, J. Monocyte function and trafficking in cardiovascular disease. *Thromb. Haemost.* **108**, 804–811 (2012).
80. Wong, K. L. *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* **118**, e16–e31 (2011).

81. Stec, M. *et al.* Chemokine Receptors and Chemokine Production by CD34<sup>+</sup> Stem Cell-derived Monocytes in Response to Cancer Cells. *Anticancer Res.* **32**, 4749–4753 (2012).
82. Cros, J. *et al.* Human CD14<sup>dim</sup> Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* **33**, 375–386 (2010).
83. Zawada, A. M. *et al.* SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood* **118**, e50–e61 (2011).
84. Smedman, C. *et al.* FluoroSpot Analysis of TLR-Activated Monocytes Reveals Several Distinct Cytokine-Secreting Subpopulations. *Scand. J. Immunol.* **75**, 249–258 (2012).
85. Tallone, T. *et al.* Heterogeneity of Human Monocytes: An Optimized Four-Color Flow Cytometry Protocol for Analysis of Monocyte Subsets. *J Cardiovasc. Transl. Res.* **4**, 211–219 (2011).
86. Auffray, C. *et al.* Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science* **317**, 666–670 (2007).
87. Randolph, G. J., Sanchez-Schmitz, G., Liebman, R. M. & Schäkel, K. The CD16<sup>+</sup> (FcγRIII<sup>+</sup>) Subset of Human Monocytes Preferentially Becomes Migratory Dendritic Cells in a Model Tissue Setting. *J. Exp. Med.* **196**, 517–527 (2002).
88. Belge, K.-U. *et al.* The Proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> Monocytes Are a Major Source of TNF. *J. Immunol.* **168**, 3536–3542 (2002).
89. Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* **87**, 373–377 (1996).
90. Schlitt, A. *et al.* CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF- $\alpha$  levels. *Thromb. Haemost.* **92**, 419–424 (2004).
91. Baeten, D. *et al.* Association of CD163<sup>+</sup> macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis. *Arthritis Rheum.* **50**, 1611–1623 (2004).

92. Saleh, M. N. *et al.* CD16<sup>+</sup> monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony- stimulating factor. *Blood* **85**, 2910–2917 (1995).
93. Yoshimoto, S. *et al.* Elevated Levels of Fractalkine Expression and Accumulation of CD16<sup>+</sup> Monocytes in Glomeruli of Active Lupus Nephritis. *Am. J. Kidney Dis.* **50**, 47–58 (2007).
94. Rogacev, K. S. *et al.* CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur. Heart J.* **32**, 84–92 (2011).
95. Heine, G. H. *et al.* CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int.* **73**, 622–629 (2008).
96. Ellery, P. J. *et al.* The CD16<sup>+</sup> Monocyte Subset Is More Permissive to Infection and Preferentially Harbors HIV-1 In Vivo. *J. Immunol.* **178**, 6581–6589 (2007).
97. Heine, G. H. *et al.* Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **8**, 362–369 (2012).
98. Murdoch, C. & Finn, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* **95**, 3032–3043 (2000).
99. Tsou, C.-L. *et al.* Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* **117**, 902–909 (2007).
100. Tamoutounour, S. *et al.* CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *Eur. J. Immunol.* **42**, 3150–3166 (2012).
101. Serbina, N. V. & Pamer, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* **7**, 311–317 (2006).
102. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 762–774 (2011).

103. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 678–689 (2007).
104. Jakubzick, C. *et al.* Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. *Immunity* **39**, 599–610 (2013).
105. Galkina Elena & Ley Klaus. Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2292–2301 (2007).
106. Shi, C. *et al.* Monocyte Trafficking to Hepatic Sites of Bacterial Infection Is Chemokine Independent and Directed by Focal Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 6266–6274 (2010).
107. Henderson, R. B., Hobbs, J. A. R., Mathies, M. & Hogg, N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood* **102**, 328–335 (2003).
108. Bain, C. C. *et al.* Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol.* **6**, 498–510 (2013).
109. Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V. & Kelsall, B. L. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J. Exp. Med.* **209**, 139–155 (2012).
110. Saalbach, A. *et al.* Fibroblasts support migration of monocyte-derived dendritic cells by secretion of PGE2 and MMP-1. *Exp. Dermatol.* **24**, 598–604 (2015).
111. Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* **141**, 52–67 (2010).
112. Guilliams, M. *et al.* IL-10 Dampens TNF/Inducible Nitric Oxide Synthase-Producing Dendritic Cell-Mediated Pathogenicity during Parasitic Infection. *J. Immunol.* **182**, 1107–1118 (2009).
113. Dal-Secco, D. *et al.* A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury. *J. Exp. Med.* **212**, 447–456 (2015).

114. Gerhardt, T. & Ley, K. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc. Res.* **107**, 321–330 (2015).
115. Combadière Christophe *et al.* Combined Inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 Abrogates Ly6Chi and Ly6Clo Monocytosis and Almost Abolishes Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Mice. *Circulation* **117**, 1649–1657 (2008).
116. Hristov, M. *et al.* Circulating monocyte subsets and cardiovascular risk factors in coronary artery disease. *Thromb. Haemost.* **104**, 412–414 (2010).
117. Rogacev, K. S. *et al.* CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monocytes Independently Predict Cardiovascular Events: A Cohort Study of 951 Patients Referred for Elective Coronary Angiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 1512–1520 (2012).
118. Naicker, S. D. *et al.* Chronic Kidney Disease Severity Is Associated With Selective Expansion of a Distinctive Intermediate Monocyte Subpopulation. *Front. Immunol.* **9**, 2845 (2018).
119. Conigrave, A. D. & Ward, D. T. Calcium-sensing receptor (CaSR): Pharmacological properties and signaling pathways. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 315–331 (2013).
120. Brown, E. M. *et al.* Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**, 575 (1993).
121. Brown, E. M., Vassilev, P. M., Quinn, S. & Hebert, S. C. G-protein-coupled, extracellular Ca(2<sup>+</sup>)-sensing receptor: a versatile regulator of diverse cellular functions. *Vitam. Horm.* **55**, 1–71 (1999).
122. Alfadda, T. I., Saleh, A. M. A., Houillier, P. & Geibel, J. P. Calcium-sensing receptor 20 years later. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **307**, C221–C231 (2014).
123. Garrett, J. E. *et al.* Molecular Cloning and Functional Expression of Human Parathyroid Calcium Receptor cDNAs. *J. Biol. Chem.* **270**, 12919–12925 (1995).
124. Ray, K., Clapp, P., Goldsmith, P. K. & Spiegel, A. M. Identification of the Sites of N-Linked Glycosylation on the Human Calcium Receptor and Assessment of Their Role in Cell Surface Expression and Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **273**, 34558–34567 (1998).

125. Ward, D. T., Brown, E. M. & Harris, H. W. Disulfide Bonds in the Extracellular Calcium-Polyvalent Cation-sensing Receptor Correlate with Dimer Formation and Its Response to Divalent Cations in Vitro. *J. Biol. Chem.* **273**, 14476–14483 (1998).
126. Houillier, P., Eladari, D., Maruani, G. & Paillard, M. Récepteur sensible au calcium : physiologie et pathologie. *Arch. Pédiatrie* **8**, 516–524 (2001).
127. O'Hara, P. J. *et al.* The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **11**, 41–52 (1993).
128. Galvez, T. *et al.* Mutagenesis and Modeling of the GABAB Receptor Extracellular Domain Support a Venus Flytrap Mechanism for Ligand Binding. *J. Biol. Chem.* **274**, 13362–13369 (1999).
129. Saidak, Z., Brazier, M., Kamel, S. & Mentaverri, R. Agonists and Allosteric Modulators of the Calcium-Sensing Receptor and Their Therapeutic Applications. *Mol. Pharmacol.* **76**, 1131–1144 (2009).
130. Bai, M. Structure–function relationship of the extracellular calcium-sensing receptor. *Cell Calcium* **35**, 197–207 (2004).
131. Brown, E. M. Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 333–343 (2013).
132. Bai, M. *et al.* Protein Kinase C Phosphorylation of Threonine at Position 888 in Ca<sup>2+</sup> o -Sensing Receptor (CaR) Inhibits Coupling to Ca<sup>2+</sup> Store Release. *J. Biol. Chem.* **273**, 21267–21275 (1998).
133. Magno, A. L., Ward, B. K. & Ratajczak, T. The Calcium-Sensing Receptor: A Molecular Perspective. *Endocr. Rev.* **32**, 3–30 (2011).
134. Brown, E. M. & MacLeod, R. J. Extracellular Calcium Sensing and Extracellular Calcium Signaling. *Physiol. Rev.* **81**, 239–297 (2001).
135. Houillier, P. Le récepteur du calcium : un rôle central dans le métabolisme calcique. *Médecine Nucl.* **33**, 39–45 (2009).

136. Kifor, O., Diaz, R., Butters, R., Kifor, I. & Brown, E. M. The Calcium-sensing Receptor Is Localized in Caveolin-rich Plasma Membrane Domains of Bovine Parathyroid Cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 21708–21713 (1998).
137. Stahlhut, M. & van Deurs, B. Identification of Filamin as a Novel Ligand for Caveolin-1: Evidence for the Organization of Caveolin-1-associated Membrane Domains by the Actin Cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **11**, 325–337 (2000).
138. Zhang, M. & Breitwieser, G. E. High Affinity Interaction with Filamin A Protects against Calcium-sensing Receptor Degradation. *J. Biol. Chem.* **280**, 11140–11146 (2005).
139. Bouschet, T., Martin, S., Kanamarlapudi, V., Mundell, S. & Henley, J. M. The calcium-sensing receptor changes cell shape via a  $\beta$ -arrestin-1–ARNO–ARF6–ELMO protein network. *J. Cell Sci.* **120**, 2489–2497 (2007).
140. Scott, M. G. H. *et al.* Cooperative Regulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation and Cell Shape Change by Filamin A and  $\beta$ -Arrestins. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3432–3445 (2006).
141. Butters, R. R. *et al.* Cloning and Characterization of a Calcium-Sensing Receptor from the Hypercalcemic New Zealand White Rabbit Reveals Unaltered Responsiveness to Extracellular Calcium. *J. Bone Miner. Res.* **12**, 568–579 (1997).
142. Riccardi, D. *et al.* Localization of the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ /polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am. J. Physiol.* **274**, F611–622 (1998).
143. Riccardi, D. *et al.* Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 131–135 (1995).
144. Chattopadhyay, N. *et al.* Identification and localization of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor in rat intestine. *Am. J. Physiol.* **274**, G122–130 (1998).
145. Cima, R. R. *et al.* Identification and functional assay of an extracellular calcium-sensing receptor in *Necturus* gastric mucosa. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **273**, G1051–G1060 (1997).



146. Buchan, A. M. J., Squires, P. E., Ring, M. & Meloche, R. M. Mechanism of action of the calcium-sensing receptor in human antral gastrin cells. *Gastroenterology* **120**, 1128–1139 (2001).
147. Busque, S. M., Kerstetter, J. E., Geibel, J. P. & Insogna, K. l-Type amino acids stimulate gastric acid secretion by activation of the calcium-sensing receptor in parietal cells. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **289**, G664–G669 (2005).
148. Justinich, C. J. *et al.* The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) on human esophagus and evidence of expression of the CaSR on the esophageal epithelial cell line (HET-1A). *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **294**, G120–G129 (2008).
149. Chakrabarty, S., Radjendirane, V., Appelman, H. & Varani, J. Extracellular Calcium and Calcium Sensing Receptor Function in Human Colon Carcinomas: Promotion of E-Cadherin Expression and Suppression of  $\beta$ -Catenin/TCF Activation. *Cancer Res.* **63**, 67–71 (2003).
150. Kállay, E. *et al.* Calcium-Dependent c-mycProto-Oncogene Expression and Proliferation of CACO-2 Cells: A Role for a Luminal Extracellular Calcium-Sensing Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 80–83 (1997).
151. Yamaguchi, T. *et al.* Mouse Osteoblastic Cell Line (MC3T3-E1) Expresses Extracellular Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )–Sensing Receptor and Its Agonists Stimulate Chemotaxis and Proliferation of MC3T3-E1 Cells. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 1530–1538 (1998).
152. Dvorak, M. M. *et al.* Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5140–5145 (2004).
153. Chattopadhyay, N. *et al.* Mitogenic Action of Calcium-Sensing Receptor on Rat Calvarial Osteoblasts. *Endocrinology* **145**, 3451–3462 (2004).
154. Mentaverri, R. *et al.* The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis. *FASEB J.* **20**, 2562–2564 (2006).

155. Lorget, F. *et al.* High Extracellular Calcium Concentrations Directly Stimulate Osteoclast Apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 899–903 (2000).
156. Zhang, C., Miller, C. L., Brown, E. M. & Yang, J. J. The calcium sensing receptor: from calcium sensing to signaling. *Sci. China Life Sci.* **58**, 14–27 (2015).
157. Grant, M. P., Stepanchick, A., Cavanaugh, A. & Breitwieser, G. E. Agonist-driven maturation and plasma membrane insertion of calcium-sensing receptors dynamically control signal amplitude. *Sci. Signal.* **4**, ra78 (2011).
158. Lorenz, S., Frenzel, R., Paschke, R., Breitwieser, G. E. & Miedlich, S. U. Functional desensitization of the extracellular calcium-sensing receptor is regulated via distinct mechanisms: role of G protein-coupled receptor kinases, protein kinase C and beta-arrestins. *Endocrinology* **148**, 2398–2404 (2007).
159. Pi, M. *et al.* Beta-arrestin- and G protein receptor kinase-mediated calcium-sensing receptor desensitization. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **19**, 1078–1087 (2005).
160. Hofer, A. M. & Brown, E. M. Calcium: Extracellular calcium sensing and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 530–538 (2003).
161. Kifor, O., Diaz, R., Butters, R. & Brown, E. M. The Ca<sup>2+</sup>-Sensing Receptor (CaR) Activates Phospholipases C, A<sub>2</sub>, and D in Bovine Parathyroid and CaR-Transfected, Human Embryonic Kidney (HEK293) Cells. *J. Bone Miner. Res.* **12**, 715–725 (1997).
162. Gama, L., Baxendale-Cox, L. M. & Breitwieser, G. E. Ca<sup>2+</sup>-sensing receptors in intestinal epithelium. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **273**, C1168–C1175 (1997).
163. Handlogten, M. E., Huang, C., Shiraishi, N., Awata, H. & Miller, R. T. The Ca<sup>2+</sup>-sensing Receptor Activates Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub> via a Gq $\alpha$ -dependent ERK-independent Pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 13941–13948 (2001).
164. Mamillapalli, R. & Wysolmerski, J. The Calcium-Sensing Receptor Couples to Gas and Regulates PTHrP and ACTH Secretion in Pituitary Cells. *J. Endocrinol.* **204**, 287–297 (2010).

165. Diez-Fraile, A., Lammens, T., Benoit, Y. & D'Herde, K. G. M. A. The calcium-sensing receptor as a regulator of cellular fate in normal and pathological conditions. *Curr. Mol. Med.* **13**, 282–295 (2013).
166. Cheng, S. X., Geibel, J. P. & Hebert, S. C. Extracellular polyamines regulate fluid secretion in rat colonic crypts via the extracellular calcium-sensing receptor. *Gastroenterology* **126**, 148–158 (2004).
167. Jensen, A. A. & Bräuner-Osborne, H. Allosteric Modulation of the Calcium-Sensing Receptor. *Curr. Neuropharmacol.* **5**, 180–186 (2007).
168. Huang, Y. *et al.* Identification and Dissection of Ca<sup>2+</sup>-binding Sites in the Extracellular Domain of Ca<sup>2+</sup>-sensing Receptor. *J. Biol. Chem.* **282**, 19000–19010 (2007).
169. Huang, Y. *et al.* Multiple Ca<sup>2+</sup> Binding Sites in the Extracellular Domain of Ca<sup>2+</sup>-Sensing Receptor Corresponding to Cooperative Ca<sup>2+</sup> Response. *Biochemistry* **48**, 388–398 (2009).
170. Nemeth, E. F. The search for calcium receptor antagonists (calcilytics). *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 15–21 (2002).
171. Nemeth, E. F. *et al.* Calcilytic Compounds: Potent and Selective Ca<sup>2+</sup>Receptor Antagonists That Stimulate Secretion of Parathyroid Hormone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 323–331 (2001).
172. Nemeth, E. F. Misconceptions About Calcimimetics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1068**, 471–476 (2006).
173. Nemeth, E. F. *et al.* Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4040–4045 (1998).
174. Nagano, N. & Nemeth, E. F. Functional Proteins Involved in Regulation of Intracellular Ca<sup>2+</sup> for Drug Development: The Extracellular Calcium Receptor and an Innovative Medical Approach to Control Secondary Hyperparathyroidism by Calcimimetics. *J. Pharmacol. Sci.* **97**, 355–360 (2005).
175. Nemeth, E. F. & Shoback, D. Calcimimetic and calcilytic drugs for treating bone and mineral-related disorders. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 373–384 (2013).

176. Smajilovic, S. *et al.* Extracellular calcium sensing in rat aortic vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 1215–1223 (2006).
177. Ziegelstein, R. C., Xiong, Y., He, C. & Hu, Q. Expression of a functional extracellular calcium-sensing receptor in human aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 153–163 (2006).
178. Tfelt-Hansen, J. *et al.* Calcium receptor is functionally expressed in rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **290**, H1165–H1171 (2006).
179. Molostvov, G. *et al.* Extracellular calcium-sensing receptor is functionally expressed in human artery. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **293**, F946–F955 (2007).
180. Alam, M. *et al.* Calcification is associated with loss of functional calcium-sensing receptor in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* **81**, 260–268 (2009).
181. Ivanovski, O. *et al.* The calcimimetic R-568 retards uremia-enhanced vascular calcification and atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (apoE<sup>-/-</sup>) mice. *Atherosclerosis* **205**, 55–62 (2009).
182. Ciceri, P. *et al.* The Calcimimetic Calindol Prevents High Phosphate-Induced Vascular Calcification by Upregulating Matrix GLA Protein. *Nephron Exp. Nephrol.* **122**, 75–82 (2012).
183. Molostvov, G., Hiemstra, T. F., Fletcher, S., Bland, R. & Zehnder, D. Arterial Expression of the Calcium-Sensing Receptor Is Maintained by Physiological Pulsation and Protects against Calcification. *PLOS ONE* **10**, e0138833 (2015).
184. Koleganova, N., Piecha, G., Ritz, E., Schmitt, C. P. & Gross, M.-L. A calcimimetic (R-568), but not calcitriol, prevents vascular remodeling in uremia. *Kidney Int.* **75**, 60–71 (2009).
185. Ureña Torres, P. A. & De Broe, M. Calcium-sensing receptor, calcimimetics, and cardiovascular calcifications in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **82**, 19–25 (2012).
186. Yamaguchi, T., Kifor, O., Chattopadhyay, N., Bai, M. & Brown, E. M. Extracellular Calcium (Ca<sup>2+</sup>)-Sensing Receptor in a Mouse Monocyte-Macrophage Cell Line (J774): Potential Mediator of the Actions of Ca<sup>2+</sup> on the Function of J774 Cells. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 1390–1397 (1998).

187. Sugimoto, T. *et al.* Effects of high calcium concentration on the functions and interactions of osteoblastic cells and monocytes and on the formation of osteoclast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* **8**, 1445–1452 (1993).
188. Bornefalk, E. *et al.* Regulation of Interleukin-6 Secretion from Mononuclear Blood Cells by Extracellular Calcium. *J. Bone Miner. Res.* **12**, 228–233 (1997).
189. Yamaguchi, T. *et al.* Enhanced Expression of Extracellular Calcium Sensing Receptor in Monocyte-Differentiated Versus Undifferentiated HL-60 Cells: Potential Role in Regulation of a Nonselective Cation Channel. *Calcif. Tissue Int.* **66**, 375–382 (2000).
190. Xi, Y. *et al.* The functional expression of calcium-sensing receptor in the differentiated THP-1 cells. *Mol. Cell. Biochem.* **342**, 233–240 (2010).
191. Massy, Z. A., Hénaut, L., Larsson, T. E. & Vervloet, M. G. Calcium-Sensing Receptor Activation in Chronic Kidney Disease: Effects Beyond Parathyroid Hormone Control. *Semin. Nephrol.* **34**, 648–659 (2014).
192. Breitwieser, G. E. Minireview: The Intimate Link Between Calcium Sensing Receptor Trafficking and Signaling: Implications for Disorders of Calcium Homeostasis. *Mol. Endocrinol.* **26**, 1482–1495 (2012).
193. Demuth, K. *et al.* Endothelin and cardiovascular remodelling in end-stage renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **13**, 375–383 (1998).
194. Joannides, R. *et al.* Altered flow-dependent vasodilatation of conduit arteries in maintenance haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **12**, 2623–2628 (1997).
195. Stam, F. *et al.* Endothelial dysfunction contributes to renal function-associated cardiovascular mortality in a population with mild renal insufficiency: the Hoorn study. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **17**, 537–545 (2006).

196. Cano-Megías, M. *et al.* Coronary calcification as a predictor of cardiovascular mortality in advanced chronic kidney disease: a prospective long-term follow-up study. *BMC Nephrol.* **20**, 188 (2019).
197. Lin, C.-J., Wu, V., Wu, P.-C. & Wu, C.-J. Meta-Analysis of the Associations of p-Cresyl Sulfate (PCS) and Indoxyl Sulfate (IS) with Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients with Chronic Renal Failure. *PloS One* **10**, e0132589 (2015).
198. Menon, V. *et al.* C-reactive protein and albumin as predictors of all-cause and cardiovascular mortality in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **68**, 766–772 (2005).
199. Munoz Mendoza, J. *et al.* Inflammation and elevated levels of fibroblast growth factor 23 are independent risk factors for death in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **91**, 711–719 (2017).
200. Raggi, P. *et al.* The ADVANCE study: a randomized study to evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on hemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **26**, 1327–1339 (2011).
201. Bellasi, A. *et al.* Presence of valvular calcification predicts the response to cinacalcet: data from the ADVANCE study. *J. Heart Valve Dis.* **22**, 391–399 (2013).
202. Sonou, T. *et al.* Mineral Composition of Phosphate-Induced Calcification in a Rat Aortic Tissue Culture Model. *J. Atheroscler. Thromb.* **22**, 1197–1206 (2015).
203. Abedin, M., Tintut, Y. & Demer, L. L. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1161–1170 (2004).
204. Collin-Osdoby, P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ. Res.* **95**, 1046–1057 (2004).
205. Doherty, T. M. *et al.* Rationale for the role of osteoclast-like cells in arterial calcification. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **16**, 577–582 (2002).
206. Cardús, A., Panizo, S., Parisi, E., Fernandez, E. & Valdivielso, J. M. Differential Effects of Vitamin D Analogs on Vascular Calcification. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 860–866 (2007).

207. Simpson, C. L. *et al.* Toward cell therapy for vascular calcification: osteoclast-mediated demineralization of calcified elastin. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* **16**, 29–37 (2007).
208. Sly, W. S., Hewett-Emmett, D., Whyte, M. P., Yu, Y. S. & Tashian, R. E. Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 2752–2756 (1983).
209. Villa-Bellosta, R., Hamczyk, M. R. & Andrés, V. Alternatively activated macrophages exhibit an anticalcifying activity dependent on extracellular ATP/pyrophosphate metabolism. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **310**, C788–C799 (2016).
210. Yu, L. *et al.* Etelcalcetide, A Novel Calcimimetic, Prevents Vascular Calcification in A Rat Model of Renal Insufficiency with Secondary Hyperparathyroidism. *Calcif. Tissue Int.* **101**, 641–653 (2017).
211. Chen, Z. *et al.* Osteogenic differentiation of bone marrow MSCs by  $\beta$ -tricalcium phosphate stimulating macrophages via BMP2 signalling pathway. *Biomaterials* **35**, 1507–1518 (2014).
212. New, S. E. P. & Aikawa, E. Molecular Imaging Insights into Early Inflammatory Stages of Arterial and Aortic Valve Calcification. *Circ. Res.* **108**, 1381–1391 (2011).
213. Vengrenyuk, Y. *et al.* A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 14678–14683 (2006).
214. Irkle, A. *et al.* Identifying active vascular microcalcification by  $^{18}\text{F}$ -sodium fluoride positron emission tomography. *Nat. Commun.* **6**, 7495 (2015).

## **Résumé**

La calcification vasculaire (CV) est définie comme un dépôt pathologique de cristaux de calcium et phosphate dans le système cardiovasculaire. Le développement de la CV est associé à la trans-différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires et à la formation progressive de cristaux d'hydroxyapatite. Aucune cellule ne semble aujourd'hui capable de limiter le développement ou de résorber la CV lorsqu'elle est déjà présente. Dans ce contexte physiopathologique, le monocyte - connu pour sa capacité à se différencier en ostéoclastes ou en macrophages - pourrait être le chaînon manquant dans le remodelage des CV. Nous avons étudié le rôle des monocytes dans le développement ou la résorption des CV *in vitro* et le rôle du CaSR dans ces phénomènes. Des segments carotidiens de rat ont été incubés pendant 5 jours dans des conditions pro-calcifiantes (phosphate inorganique 3,8 mM). Des lignées cellulaires monocytaires humaines (U937 ou THP-1) et des cellules PBMC ont été ajoutées aux segments carotidiens, d'une part pendant les 5 jours nécessaires à l'induction des CV - modèle « Préventif » - ou d'autre part pendant 5 jours après les 5 jours de culture nécessaires au développement des calcifications - modèle « Curatif » -. Deux agents pharmacologiques, un calcilytique (NPS-2143 [41 nM]) ou un calcimimétique (NPS-R568 [100 nM]), ont été utilisés pour faire varier le seuil de sensibilité du CaSR des monocytes. Dans le modèle « Préventif », le processus de CV est significativement réduit lorsque la calcification carotidienne est réalisée en présence d'au moins  $1.10^5$  monocytes/mL. Des résultats similaires ont été obtenus dans le modèle « Curatif », suggérant que les monocytes participent à la décalcification vasculaire. Impliquant le CaSR dans ce phénomène, la pré-incubation des monocytes avec le NPS-2143 inhibe significativement leur capacité à prendre en charge la CV *in vitro* dans les modèles « Préventif » et « Curatif ». Inversement, le NPS-R568 améliore les capacités des monocytes pour protéger la carotide de la calcification. Ces données indiquent que la stimulation du CaSR monocyttaire jouerait un rôle protecteur face au développement des calcifications. Elles renforcent nos connaissances concernant l'action exercée par les calcimimétiques lors de la prise en charge des CV et permettent d'envisager l'activité décalcifiante exercée par certain monocyte comme une nouvelle cible thérapeutique dans la prise en charge de cette pathologie.

**Mots clés :** calcification vasculaire (CV), monocyte, récepteur sensible au calcium (CaSR)

## **Abstract**

Vascular calcification (VC) is defined as a pathological deposit of calcium phosphate crystals throughout the cardiovascular system. The development of VC is associated to vascular smooth muscle cells transdifferentiation, the progressive formation of hydroxyapatite crystals. No cell today seems capable of limiting development or resorbing the VC when it is already present. In this physiopathological context, the monocyte - known for its ability to differentiate into osteoclasts or macrophages - could be the missing link in remodeling VCs. We studied the role of monocytes in the development or resorption of VC *in vitro* and the role of CaSR in these phenomena. Rat carotid segments were incubated for 5 days in a pro-calcifying conditions (3.8 mM inorganic phosphate). Human monocyte cell lines (U937 or THP-1) and PBMC cells were added to carotid segments, in one hand during the 5 days necessary for the induction of VC - "Preventive" model - or on the other hand for 5 days after the 5 days of culture necessary for the development of the calcifications - "Curative" model -. Two pharmacological agents, a calcilytic (NPS 2143 [41nM]) or a calcimimetic (NPS R568 [100nM]) were used to vary the sensitivity threshold of monocyte CaSR. In the "Preventive" model, VC process is significantly reduced when the carotid calcification is performed in the presence of at least  $1.10^5$  monocytes/mL. Similar results were obtained in the "Curative" model, suggesting that monocytes help in vascular decalcification. Implicating the CaSR in this phenomenon, pre-incubation of monocytes with NPS 2143 significantly inhibits their ability to support VC *in vitro* in both the "Preventive" and "Curative" models. Oppositely, NPS-R568 improves monocyte capacities to protect the carotid from calcification. These data indicate that the stimulation of monocyte CaSR would play a protective role against the development of calcifications. They reinforce our knowledge about the action exerted by calcimimetics in the management of VC and allow us to consider the decalcifying activity exerted by a monocyte subpopulation as a new therapeutic target in the management of this pathology.

**Keys words:** vascular calcification (VC), monocyte, calcium-sensing receptor (CaSR)