



HAL
open science

Rôle des cellules endothéliales dans la calcification vasculaire induite lors de l'insuffisance rénale chronique, étude d'un mécanisme IL-8 dépendant

Jeanne Bou Abdallah

► To cite this version:

Jeanne Bou Abdallah. Rôle des cellules endothéliales dans la calcification vasculaire induite lors de l'insuffisance rénale chronique, étude d'un mécanisme IL-8 dépendant. Sciences agricoles. Université de Picardie Jules Verne, 2018. Français. NNT : 2018AMIE0003 . tel-03692103

HAL Id: tel-03692103

<https://theses.hal.science/tel-03692103>

Submitted on 9 Jun 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 Biologie et Santé

Spécialité maladies vasculaires - remodelage

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

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Jeanne BOU ABDALLAH

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

Rôle des cellules endothéliales dans la calcification vasculaire induite lors de l'insuffisance rénale chronique, étude d'un mécanisme IL-8 dépendant.

Soutenue le 21 septembre 2018, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen:

M. Vincent RICHARD, PU-PH

Rapporteur

M^{me} Marie-Hélène LAFAGE-PROUST, PU-PH

Rapporteur

M^{me} Eva HAMADE, PU

Examineur

M. Julien MAIZEL, PU-PH

Examineur

M. Youssef BENNIS, MCU-PH

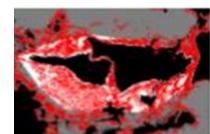
Co-encadrant de thèse

M. Said KAMEL, PU-PH

Directeur de thèse

M. Kazem ZIBARA, PU

Co-directeur de thèse



Résumé

La calcification vasculaire (CV) est le dépôt pathologique de sels de phosphate de calcium, sous forme d'hydroxyapatite, dans la paroi artérielle. Cette CV contribue à la rigidité et au rétrécissement des artères et elle est amplifiée lors de l'insuffisance rénale chronique (IRC) suite à l'accumulation des toxines urémiques dans le sang et les tissus, telles que l'indoxyl sulfate (IS) et le phosphate (Pi). Or la paroi vasculaire est constituée, entre autres, de cellules endothéliales (CE), en contact direct avec le sang et les toxines urémiques, et de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) responsables de la CV de par leur origine commune avec la cellule ostéoblastique. Des niveaux élevés d'IS et de Pi entraînent un dysfonctionnement des CE et la transdifférenciation ostéogénique des CMLV. Du fait de l'importance de la communication CE-CMLV dans la formation et la fonction des vaisseaux sanguins et son implication dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, nous nous sommes intéressés à étudier la contribution des CE dans les calcifications produites par les CMLV lors de l'IRC. Nous avons montré qu'une concentration élevée en Pi induit une calcification des CMLV en culture, que cet effet est plus important par l'ajout d'IS et qu'il est significativement amplifié en présence de milieu conditionné des CE préalablement exposées aux mêmes toxines. De façon intéressante, nous avons également montré pour la première fois que l'exposition des CE à Pi+IS entraîne une augmentation significative de l'expression et de la sécrétion d'Interleukine -8 (IL-8) et que celle-ci aggrave de façon concentratoïn-dépendante la calcification des CMLV. Bien que l'IL-8 ne semble pas accentuer la transdifférenciation des CMLV induite par les toxines urémiques, elle empêche la synthèse et la sécrétion par les CMLV d'OPN, un inhibiteur puissant de calcification. De plus, le traitement des CMLV par un antagoniste des récepteurs de l'IL-8 permet de rétablir la synthèse d'OPN par les CMLV exposées à Pi+IS. Par ailleurs, nous avons confirmé à l'échelle tissulaire que Pi+IS induit une augmentation de la calcification des

anneaux aortiques de rats isolés et stimule de façon significative l'expression des homologues chez le rat de l'IL-8. De façon intéressante, l'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 prévient partiellement la calcification induite par Pi+IS, tout en favorisant l'induction de l'expression d'OPN. Ainsi, notre travail suggère un nouveau rôle de l'IL-8 agissant en tant que médiateur impliqué dans l'interaction entre CE et CMLV au cours de la CV. De plus, l'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 bloque l'effet promoteur de l'IL-8 sur la CV d'où son potentiel intérêt pharmacologique dans la prévention des complications cardiovasculaires lors de l'IRC.

Mots clés: calcification vasculaire, toxines urémiques, transdifférenciation ostéogénique, athérosclérose, interaction des cellules vasculaires.

Abstract

Vascular calcification (VC) is the ectopic deposition of calcium minerals in the major arteries. This VC contributes to the stiffness and narrowing of the arteries, and is amplified during chronic kidney disease (CKD) due to the accumulation of uremic toxins in the blood and tissues, such as indoxyl sulfate (IS) and inorganic phosphate (Pi). The vascular wall consists, among others, of endothelial cells (EC) in direct contact with the blood and the uremic toxins, and of vascular smooth muscle cells (VSMC) responsible for VC due to their common development origin with the osteoblast: the mesenchymal stem cells. High levels of IS and Pi result in EC dysfunction, osteogenic switch of VSMC and subsequent VC. Because of the importance of EC-VSMC communication in the formation and function of blood vessels and its involvement in many cardiovascular diseases, we were interested in studying the contribution of EC in the calcifications produced by VSMC during CKD. First, we confirmed in a VSMC culture and in tissue model of rat aortic rings that a high concentration of Pi induces calcification and that this effect is potentiated by IS. Then we showed for the first time, that ECs exposed to Pi+IS secrete IL-8 which significantly aggravates the calcification of VSMC. Although IL-8 does not enhance the uremic toxins-mediated osteogenic switch of VSMC, it prevents the synthesis of OPN by VSMC, resulting in an undesirable imbalance between VC inducers and inhibitors. The IL-8 receptors antagonist unblocks the synthesis of OPN by VSMC in the uremic condition. In parallel, uremic toxins induce expression of IL-8 homologs in the rat aortic rings, and the IL-8 receptors antagonist partially prevents Pi+IS-induced calcification, while unblocking the expression of OPN. Our work suggests a novel role of IL-8 in promoting VC as a mediator of ECs-VSMCs interaction during uremic disease. Blocking IL-8 would thus be a new therapeutic approach for cardiovascular complications prevention in CKD.

Key words: vascular calcification, uremic toxins, osteogenic switch, atherosclerosis, vascular cells interaction.

Remerciements

Il est presque impossible de remercier tous ceux qui m'ont aidée à mener ma thèse à son terme.

Je voudrais remercier en premier lieu mes directeurs de thèse le *Dr Youssef Bennis*, le *Pr Saïd Kamel* et le *Pr Kazem Zibara* pour m'avoir donné l'opportunité d'élaborer mes travaux de thèse.

J'adresse de chaleureux remerciements au *Dr Youssef Bennis* qui m'a accompagnée tout au long de mon parcours. Je suis chanceuse pour avoir passé non seulement ma thèse mais aussi mon stage de recherche Master 2 sous sa direction. Son attention de tout instant envers mes travaux, sa disponibilité, ses conseils avisés et son encadrement sont sincèrement appréciés. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec lui.

Je remercie le *Pr Saïd Kamel* pour sa confiance, son temps et son encadrement. Merci de m'avoir accueillie au sein du laboratoire *MP3CV*.

Je tiens à remercier mon directeur le *Pr Kazem Zibara* pour être le premier à voir mon potentiel et m'aider à l'épanouir. Sans sa confiance en moi et son support je n'aurais entamé ce travail. Un grand merci pour son temps, ses conseils et son aide dans tout sujet administratif et éducatif.

Je voudrais remercier le *Pr Marie-Hélène Lafage-Proust* et le *Pr Vincent Richard* qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse.

J'associe à ces remerciements le *Pr Eva Hamade* et le *Pr Julien Maizel* pour avoir accepté d'examiner ma thèse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de l'*Université Libanaise* et du *Ministère Français de l'Europe et des Affaires étrangères*, qui m'ont permis, grâce à leurs aides financières, de mener à bout ma thèse.

Remerciements

Une gratitude spéciale à *Aurélien, Carine, Cathy, Cédric, Chantale, Gaëlle, Laurent et Sabrina* qui ont offert leur expertise et un dévouement à m'aider. Merci pour toutes les connaissances qu'ils m'ont transmises et pour leur aide.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à *Isabelle, Marlene et Romuald* pour les nombreux encouragements qu'ils m'ont prodigués.

Un grand merci à mes collègues *Ali, Lucie, Michael, Maria, Nisrine, Olivier et Thibaut*, pour leur convivialité et pour avoir partagé cette expérience avec moi.

I would like to especially thank *Souvik*, my partner in crime, for being my go-to guy in all things technology and movies; for the occasional basketball games and the one game of soccer against a couple of ten year olds, luckily for our dignity we managed a 5-5 tie; for all the meaningful debates and the not so meaningful ones too. Our coffee breaks, song challenge and Friday pizzas (however short-lived they were) gave me something to look forward to and a space to breathe in my everyday life. I thought I was only getting a diploma but I am lucky to have gained a friend for life.

Je sais tout particulièrement gré à *Hawraa* qui est devenue comme une sœur pour moi. Merci pour les plats que nous avons cuisinés et partagés ensemble, peut-être nous ferons un jour le «cooking vlog» dont nous avons tant parlé; pour nos nombreux voyages ensemble, pour avoir supporté mon sens de l'humour particulier, mon sarcasme et mes nombreuses tirades, pour mon éducation sur tout ce qui est lié à l'univers de Disney, pour son aide dans mes travaux de thèse et pour avoir partagé avec moi les longues heures de la rédaction de la thèse, je n'aurais pas pu mener à bout ma thèse sans son support. Je la remercie du fond de mon cœur.

Je désire en outre remercier *Ahmed et Ihsan, Walaa et Hussein, Ali Jaafar, Zahraa, Hiba, Fatima, Ali Moussawi, Hamza, Abdelrahman, Ali Nehme, Hakim et Kahia, Tanja et Priscilla* pour m'avoir offert une famille dans un pays étranger.

Remerciements

Des grands remerciements à mes sœurs *Paméla, Fabiola, Letitia* et *Rita*. Il n'y a pas assez de mots dans le dictionnaire pour décrire le lien entre sœurs, et je suis bénie d'en avoir quatre. N'importe ce que cache l'avenir, je me sens à l'aise avec elles comme mon support.

À mes tantes *Souad, Wadad* et *Hind*, qui sont comme des mes mères pour moi, et mon grand-père, j'adresse des remerciements chaleureux pour leur amour et leur support pendant toute ma vie.

Ma dernière et plus grande gratitude est réservée à ceux qui n'attendent aucune, à *Maman* et *Papa*, je leur dois tout!

Je dédie cette thèse à ma *grand-mère Taminée*. J'ai reçu la nouvelle de sa mort quand je rédigeais ma thèse, et à l'époque je ne pouvais pas me permettre de succomber à mon chagrin, alors je l'ai sauvegardé pour plus tard. Maintenant j'ai le temps mais plus l'envie de pleurer. Au lieu, je voudrais célébrer sa vie riche et fructueuse. Elle était le lien qui unit la famille et le sera toujours. Elle vit à travers sa famille et j'espère que nous la rendons fière.

Table des matières

Résumé	1
Abstract	3
Remerciements.....	5
Abréviations	10
Liste des Figures	15
Liste des Tableaux	19
1. Importance du dialogue CE-CMLV	25
1.1. Rappel sur la paroi vasculaire.....	25
1.2. Dialogue CE-CMLV physiologique	26
1.3. Dialogue CE-CMLV pathologique.....	35
2. Calcification Vasculaire	43
2.1. Définition	43
2.2. Types de calcification vasculaire.....	46
2.3. Liens entre calcifications squelettique et vasculaire.....	50
2.4. Pathogenèse des CV.....	53
3. Insuffisance Rénale Chronique	65
3.1. Généralités	65
3.2. Impact de l'IRC sur la CV.....	70
3.3. Rôle du phosphate durant l'IRC.....	72
3.4. Rôle des toxines urémiques.....	75
Modèle Cellulaire:	93
a) CMLV humaines	93
b) HUVEC.....	94
Toxines urémiques.....	94
Préparation des milieux conditionnés.....	94
Induction de calcification.....	95
Relation concentration-effet de l'IL-8	95
Transfection d'un siRNA IL-8	96
Anticorps neutralisant l'IL-8.....	97
Antagoniste des récepteurs de l'IL-8	97
Supplémentation en OPN	98

Supplémentation en ICAM-1	98
Mesure de la calcification des CMLVH	98
Cytokine Array	99
ELISA	100
Extraction des ARN	101
Transcription inverse	102
Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)	102
Modèle d'anneau aortique de rat	103
a) Mesure du calcium vasculaire	104
b) RT-qPCR	104
c) Immunohistochimie	105
Analyses statistiques:	106
1. L'EC-CM aggrave l'effet de Pi/IS sur la calcification des CMLVH	108
2. Pi+IS induit l'expression et la sécrétion d'IL-8 à partir des CE	112
3. L'IL-8 est responsable de la calcification induite par l'EC-CM	115
4. L'IL-8 n'accentue pas la transdifférenciation ostéogénique induite par les toxines urémiques	120
5. L'IL-8 empêche l'augmentation de l'expression et de la sécrétion d'OPN par les CMLVH	122
6. L'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 inhibe la calcification des anneaux aortiques de rat	125
Discussion	130
Conclusion	142
Limites et Perspectives	144
Valorisation du travail	170
1. Communications affichées:	170
2. Communications orales:	170
3. Article	170

Abréviations

α -SMA: alpha smooth muscle cell actin

ACE: Enzyme de la conversion de l'angiotensine

ADAM: A disintegrin and metalloproteinase

aFGF: Acidic fibroblast growth factor

AhR: Récepteur d'hydrocarbure aryle

Alb: Albumine

ALK: Activin receptor-like kinase

ALP: Phosphatase alcaline

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

Ang: Angiopoïétine

AT: Angiotensine

bFGF: Basic fibroblast growth factor

BMP: Bone morphogenetic protein

BSA: Albumine de sérum bovin

Cbfa1: Core-binding factor alpha 1

CE: Cellules endothéliales

Cellules 10T1/2: cellules multipotentes embryonnaires murines

CMLV: Cellule musculaire lisse vasculaire

CMLVH: CMLV humaine

CV: Calcification vasculaire

COX-2: Cyclooxygénase-2

Cx: Connexines

DFG: Débit de filtration glomérulaire

DKK: Dickkopf

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DSL: Delta-like protein

EC-CM: Milieu conditionné des CE

ECD: Domaine extracellulaire

EDHF: facteurs hyperpolarisants endothéliaux

EET: Epoxy eicosatrienoic acid

EBM-2: Endothelial cells basal medium-2

EGM-2: Endothelial cell growth medium-2 bulletKit

eNOS: Endothelial nitric oxide synthase

ERO: Espèces réactives de l'oxygène

ET: Endothéline

Fet A: Fetuin A

G: Grossissement

Glx: Glutamax

GMPc: Guanosine monophosphate cyclique

HDL: Lipoprotéines de haute densité

HUVEC: Cellule endothéliale du cordon ombilical humain

ICAM: Intercellular adhesion molecule

ICD: Domaine intracellulaire

IGF: Insulin-like growth factor

IFN- γ : Interferon- γ

IL: Interleukin

IP: Récepteur du prostacycline

IRC: l'insuffisance rénale chronique

IS: Indoxyle sulfate

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LAP: Protéine de latence

LDL: Low density lipoprotein

LRP-1: LDL receptor-related protein-1

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MCP: Monocyte chemoattractant protein

M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor

MEJ: Jonctions myoendothéliales communicantes

MGP: Matrix Gla protein

MIP1 α : Macrophage inflammatory protein 1 alpha

MLCK: Kinase de la chaîne légère de la myosine

MMP: Matrice métalloprotéase

MP: Microvésicules

NO: Monoxyde d'azote

OCN: Osteocalcine

OPG: Ostéoprotégrine

OPN: Ostéopontine

oxLDL: LDL oxydée

P: Pénicilline

PDGF-B: Facteur de croissance-B dérivé des plaquettes

PDGFR: Récepteur du PDGF

PECAM: Platelet endothelial cell adhesion molecule

PGI₂: Prostacycline

Pi: Phosphate inorganique

PKA: Protéine kinase A

PKG: Protéine kinase GMPC-dépendante

pmh: Par million d'habitants

pp-ET1: Préproendothéline

PPi: Pyrophosphate inorganique

RANK: Receptor activator of nuclear factor κ B

REIN: Réseau épidémiologique et information en néphrologie

RGD: Arginine-glycine-acide aspartatique

ROCK: Protéines kinases associées à Rho

RUNX2: Runt-related transcription factor 2

S: Streptomycine

scr siRNA: Scrambled small interfering RNA

SDF: Stromal cell-derived factors 1-alpha

SEM: Écart type moyen

Ser: Sérine

Shh-N: Sonic hedgehog N-terminus

SIBLING: Small intertrilin-binding N-linked glycoprotein

siRNA: Small interfering RNA

smad: Small mothers against decapentaplegic

SMMHC: Smooth muscle myosin heavy chain

SVF: Sérum bovin foetal

SM22 α : Smooth muscle cell specific protein 22 alpha

TGFβ: Transforming growth factor β

Thr: Thréonine

Tie: Famille de récepteurs tyrosine kinases

TNFα: Tumor necrosis factor alpha

Tph1: Hydroxylase du tryptophane 1

TRANCE: Tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine

VCAM-1: Vascular cell adhesion protein 1

VE-cadhérine: Vascular endothelial Cadherin

VEGF: Facteur de croissance endothélial vasculaire

Liste des Figures

Figure 1: Structure de la paroi artérielle	25
Figure 2: Stabilisation des vaisseaux sanguins	27
Figure 3 Rôle des facteurs de croissance dans l'angiogenèse post-ischémique	28
Figure 4: Régulation du tonus vasculaire par le NO.....	30
Figure 5: Représentation schématique récapitulative de la vasodilatation endothélium-dépendante	32
Figure 6: Modèle tridimensionnel de l'angiogenèse.....	33
Figure 7: Contact CE-CMLV médié par Notch	34
Figure 8: L'effet néfaste de l'ET1 sécrétée par les CE sur les CMLV	36
Figure 9: La sérotonine, transloquée à l'intérieur des CMLV par des jonctions communicantes, induit un remodelage vasculaire	38
Figure 10: Développement de la lésion athérosclérotique	39
Figure 11 : Les CE sécrètent la BMP2 en tant que signal paracrine RANK/RANKL-dépendant.....	42
Figure 12: Prévalence des CV par groupe d'âge pour les femmes (A) et les hommes (B)	43
Figure 13: Ratios de la mortalité cardiovasculaire en présence de CV.....	44
Figure 14: Ratios de toutes causes confondues de mortalité en présence de CV	45
Figure 15: Prédiposition aux calcifications vasculaires chez les patients atteints d'IRC	46
Figure 16: Les différences entre la calcification artérielle médiale et athérosclérotique	48
Figure 17: Photographies d'une valve aortique normale (a) et calcifiée (b).....	50
Figure 18: Métaplasies osseuse et cartilagineuse dans les calcifications artérielles médiales	51

Figure 19: Transdifférenciation des CMLV en cellules ostéogéniques résultant en CV .	52
Figure 20: Représentation schématique des mécanismes de CV	54
Figure 21: La différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes	56
Figure 22: Radiographie des souris Fet A-nulles	58
Figure 23: Structure protéique de l'OPN.....	60
Figure 24: La décalcification des plaques athérosclérotiques par l'OPN	62
Figure 25: Représentation schématique de l'effet OPN et p-OPN sur les CMLV et les CE	63
Figure 26: Représentation schématique récapitulative des déterminants moléculaires de la transdifférenciation ostéogénique.....	64
Figure 27: Prévalence de l'IRC au stade terminal selon l'âge et le sexe	66
Figure 28: Incidence de l'IRC au stade terminal selon l'âge et le sexe	68
Figure 29: Rapport annuel de REIN en 2015 pour les patients au stade terminal d'IRC	69
Figure 30: Ratio de maladies cardiovasculaires en présence d'IRC	70
Figure 31: La mortalité par évènement cardiovasculaire des patients atteints d'IRC au stade terminal	72
Figure 32: Transdifférenciation ostéogénique des CMLV sous l'effet de Pi	73
Figure 33: Mécanismes d'action du Pi sous le contrôle de Pit-1	74
Figure 34: La concentration sérique d'IS chez les patients atteints d'IRC	76
Figure 35: Représentation schématique de l'origine de l'IS	77
Figure 36: La mortalité cardiovasculaire en fonction de la concentration sérique en IS	78
Figure 37: La mortalité toutes causes confondues en fonction de la concentration sérique en IS	79

Figure 38: Les propriétés physicochimiques de l'IS rendent la dialyse conventionnelle inefficace.....	81
Figure 39: Rapport de l'étude clinique sur le régime pauvre en protéines et de son suivi à long terme.....	83
Figure 40: Représentation schématique du mode d'action de l'AST-120.....	84
Figure 41: L'effet de l'IS sur le dysfonctionnement endothélial.....	86
Figure 42: L'EC-CM aggrave l'effet de Pi et de Pi+IS sur la calcification des CMLVH	110
Figure 43: Effet du KCl, de l'albumine et du milieu de culture basal des CE sur la calcification des CMLVH	111
Figure 44: Pi+IS induit l'expression et la sécrétion d'IL-8 par les CE.....	114
Figure 45: IL-8 accentue l'effet de Pi et de Pi+IS sur la calcification des CMLVH.....	115
Figure 46: L'IL-8 est responsable de la calcification induite par l'EC-CM.....	117
Figure 47: La transfection d'un siRNA IL-8 inhibe significativement l'expression de l'IL-8 dans les HUVEC	118
Figure 48: La calcification induite par l'EC-CM provient de l'IL-8 exprimée par les HUVEC	119
Figure 49: L'IL-8 n'accroît pas la transdifférenciation ostéogénique des CMLVH induite par Pi+IS	121
Figure 50: L'IL-8 empêche l'induction de l'OPN par le Pi+IS dans les CMLVH	123
Figure 51: La supplémentation d'OPN empêche la calcification des CMLVH induite par Pi+IS	124
Figure 52: Pi et Pi+IS induisent la calcification des anneaux aortiques de rats.....	125
Figure 53: Pi+IS induit l'expression des homologues de l'IL-8 chez le rat.....	126

Figure 54: L'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 inhibe la calcification des anneaux aortiques de rat.....	127
Figure 55: L'antagoniste SCH527123 des récepteurs de l'IL-8 induit l'expression de l'OPN dans les anneaux aortiques de rat en présence Pi+IS.....	128
Figure 56: L'ICAM-1 n'accentue pas l'effet de Pi+IS sur la calcification des CMLVH137	
Figure 57: Effet proposé des CE exposées à Pi+IS sur la calcification produite par les CMLV.....	140
Figure 58: Effet protecteur proposé de l'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 (SCH) contre la calcification produite par les CMLV	141

Liste des Tableaux

<i>Tableau 1: Séquences des amorces pour la quantification de l'expression des gènes humains</i>	103
<i>Tableau 2: Séquences des amorces pour la quantification de l'expression des gènes murins</i>	105
<i>Table 3: Les CE sous l'effet de Pi+IS sécrètent de l'IL-8 et de l'ICAM-1 soluble</i>	113

Préambule

La paroi vasculaire est constituée, entre autres, des cellules endothéliales (CE) en contact direct avec le sang et des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) responsables de la contractilité des vaisseaux¹. L'interaction entre les CE et les CMLV est essentielle pour le bon fonctionnement des vaisseaux sanguins, aussi bien lors de leur formation, que lors de leur maturation et leur remodelage²⁻⁴. Les CE initient la communication intercellulaire dès l'embryogenèse en transmettant un signal pour recruter les précurseurs des CMLV à partir des tissus environnants^{2,5}, et restent essentielles à l'entretien des vaisseaux matures. D'autres signaux permettant la régulation du tonus vasculaire viennent s'ajouter au dialogue CE-CMLV dans les artères matures^{3,4}. La dérégulation de ce dialogue engendre des maladies diverses telles que l'athérosclérose et l'hypertension artérielle⁶, mais elle n'a pas été étudiée spécifiquement dans le cadre de la calcification vasculaire (CV).

La CV est le dépôt pathologique de sels de phosphate de calcium, sous forme d'hydroxyapatite, dans la paroi artérielle. La plupart des individus âgés de plus de 60 ans présentent une augmentation progressive du dépôt de calcium dans leurs principales artères⁷. Cette CV réduit l'élasticité et induit un rétrécissement aortique et artériel, ce qui altère l'hémodynamique cardiovasculaire, entraînant une morbidité et une mortalité importantes sous forme d'hypertension, de sténose aortique, d'hypertrophie cardiaque, d'ischémie myocardique et des membres inférieurs et d'insuffisance cardiaque⁸. La sévérité et l'étendue de la minéralisation prédisent fortement et indépendamment la morbidité et la mortalité cardiovasculaires et la mortalité toutes causes confondues^{9,10}. Dans le passé, la CV a été considérée comme un processus passif; cependant, des recherches récentes ont révélé de nombreuses similitudes avec des processus actifs et contrôlés se produisant dans le tissu osseux. En effet, les CMLV et les ostéoblastes partagent un précurseur commun de développement; qui est la cellule souche mésenchymateuse. Cette origine commune peut faciliter la transdifférenciation des CMLV en cellules ostéogéniques en réponse à une variété de stimuli, tels que l'augmentation des taux

sériques de calcium et de phosphate inorganique (Pi), l'accumulation de lipides et les réponses inflammatoires^{11,12}.

La CV est fréquente chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC) et contribue au risque accru d'événements cardiovasculaires¹³. L'IRC entraîne la rétention de toxines urémiques qui s'accumulent dans le sang et les tissus au lieu d'être excrétées par les reins telles que l'indoxyle sulfate (IS). L'IS est une toxine dérivée des protéines alimentaires qui induit un dysfonctionnement des CMLV et des CE¹⁴. Des études récentes ont montré que les CMLV, exposées à l'IS ou aux séra urémiques des patients atteints d'IRC, génèrent un dépôt de calcium *in vitro* et expriment des marqueurs d'ostéoblastes^{14,15}. L'IS induit également un stress oxydatif dans les CE, altérant ainsi leur production de monoxyde d'azote (NO), leur prolifération, leur migration et leur viabilité¹⁶⁻¹⁸. Les CE sont également stimulées par l'IS pour induire une inflammation vasculaire par l'activation de l'expression de l'E-sélectine^{19,20} et la libération de facteurs pro-inflammatoires tels que la MCP-1²¹.

Outre l'accumulation de l'IS dans le sang, l'hyperphosphatémie est aussi rencontrée chez les patients atteints d'IRC. Or, des concentrations élevées de Pi induisent une CV et sont corrélées à une mortalité élevée dans les stades avancés de l'IRC²². Les CMLV humaines perdent leurs marqueurs contractiles et gagnent des marqueurs ostéogéniques en réponse aux niveaux élevés de phosphate²³; et les CE deviennent défectueuses et conduisent à des altérations de la perméabilité vasculaire, de la formation de thrombus, de l'angiogenèse et de la vasodilatation dépendante de l'endothélium²⁴.

Puisque les CE sont directement exposées aux toxines urémiques contenues dans le sang, et que l'interaction CE-CMLV a été impliquée dans nombreuses pathologies, il serait intéressant d'étudier la contribution des CE aux effets des toxines urémiques sur la CV produite par les

CMLV. Ainsi, notre travail a testé l'hypothèse selon laquelle les toxines urémiques provoquent la sécrétion par les CE de facteurs favorisant la CV induite par les CMLV.

Introduction

Bibliographique

1. Importance du dialogue CE-CMLV

1.1. Rappel sur la paroi vasculaire

La paroi vasculaire des artères est constituée de trois couches différentes: l'intima, la média et l'adventice. L'intima contient des cellules endothéliales (CE) en contact direct avec le sang.

Les CE sont séparées des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) de la média par une lame élastique interne. La troisième couche, l'adventice, contient de nombreux composants, y compris les nerfs sympathiques, le collagène et les fibroblastes (Figure 1)¹.

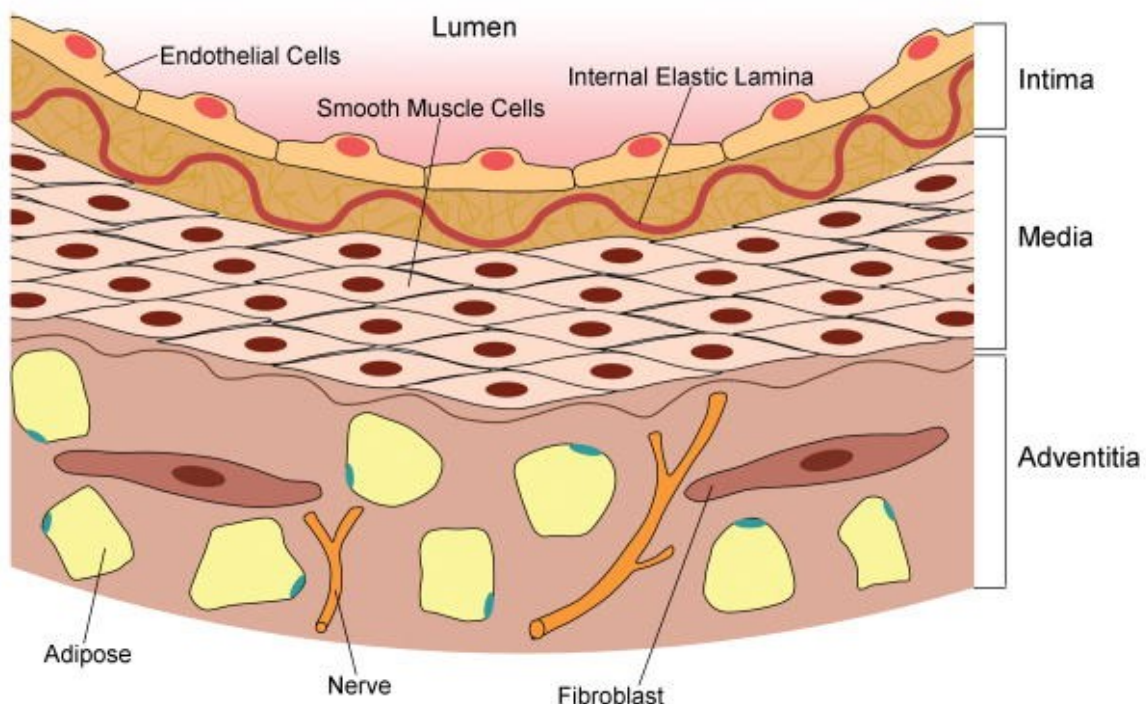


Figure 1: Structure de la paroi artérielle¹

La structure des vaisseaux sanguins n'est pas constante mais est continuellement remodelée pour leur permettre de remplir leur fonction de distribution du sang. Cette fonction dépend de l'état de la contraction des CMLV individuelles, de leur nombre et de leur agencement²⁵. Les

grandes artères sont formées de plusieurs couches de CMLV intégrées dans une matrice extracellulaire riche en collagène et élastine vitale pour le flux pulsatile, alors que les veines, à basse pression, ont moins de couches de CMLV et une matrice extracellulaire moins complexe. Les capillaires contiennent un nombre limité de CMLV avec des CE extrêmement perméables pour permettre une diffusion maximale de gaz et nutriments aux cellules. Malgré la diversité des vaisseaux sanguins, les fonctions des CE et des CMLV restent inchangées⁶. Le dialogue entre les CE et les CMLV est essentiel pour leur bon fonctionnement, aussi bien lors de la formation, que lors de la maturation et du remodelage des vaisseaux sanguins²⁻⁴. Les CE initient la communication dès l'embryogenèse en transmettant un signal pour recruter les précurseurs des CMLV à partir des tissus environnants^{2,5}, et restent essentiels à l'entretien des vaisseaux matures. D'autres signaux relatifs au tonus et à la pression artérielle participe également au dialogue entre CE et CMLV dans les artères matures^{3,4}. Ces informations peuvent être transmises par plusieurs mécanismes : par sécrétion de molécules ou par contact physique direct⁶. Cette communication diffère selon l'état du vaisseau sanguin. Nous aborderons le dialogue CE-CMLV dans le contexte physiologique dans la partie suivante.

1.2. Dialogue CE-CMLV physiologique

Le dialogue normal entre les CE et les CMLV se fait par deux mécanismes principaux: la sécrétion de molécules solubles et le contact membranaire direct CE-CMLV.

➤ Signal paracrine

Dès l'embryogenèse, les CE sécrètent le facteur de croissance-B dérivé des plaquettes (PDGF-B)^{5,26}. Les précurseurs des CMLV des tissus environnants expriment le récepteur PDGFR, à

activité tyrosine kinase, ce qui engendre leur recrutement et leur prolifération, ainsi que la formation du vaisseau stable. Ce rôle clé du PDGF-B dans la migration et la prolifération des CMLV a été confirmé *in vitro* et *in vivo* (Figure 2)²⁶⁻²⁸.

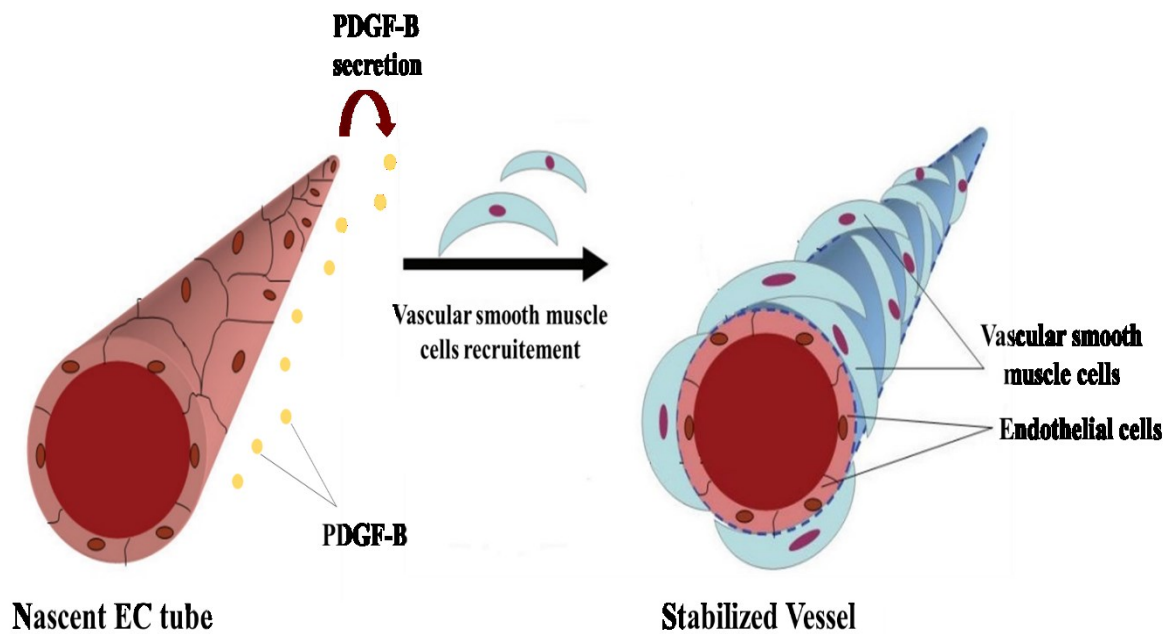


Figure 2: Stabilisation des vaisseaux sanguins

Les CE recrutent les précurseurs des CMLV à partir des tissus environnants par la sécrétion de PDGF-B (Figure adaptée de Jiang et al)²⁷.

Cependant, certaines voies de signalisation peuvent interférer dans la communication CE-CMLV PDGF-B dépendante; Boucher *et al* ont montré *in vivo* que la perte du «Low density lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein-1» (LRP-1) qui régule l'expression et l'activité et du PDGFR dans les CMLV, amplifie l'expression de PDGFR et la prolifération des CMLV, résultant en une fibrose et athérosclérose²⁹. En outre, le Transforming Growth Factor β (TGF β) joue un rôle similaire que le PDGF-B dans le recrutement des précurseurs des CMLV induit par les CE démontré *in vitro* en utilisant des cellules multipotentes embryonnaires murines (cellules 10T1/2) en co-culture avec des CE qui commencent à présenter des similitudes morphologique

et d'expression génétique avec les CMLV. De même, la greffe sous-cutanée des cellules 10T1/2 fluorescentes dans des souris a montré *in vivo* que ces cellules 10T1/2 sont incorporées dans la média des vaisseaux et se différencient en CMLV³⁰. De plus, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) est un autre régulateur du développement et de la stabilisation des vaisseaux sanguins. Bien qu'il induise la prolifération et la migration des CE, le VEGF détache aussi les CMLV des vaisseaux sanguins³¹. Le rôle du VEGF est important dans l'angiogenèse pour l'irrigation sanguine du tissu notamment en cas d'ischémie, de même que la famille des angiopoïétines (Ang) (Figure 3)³².

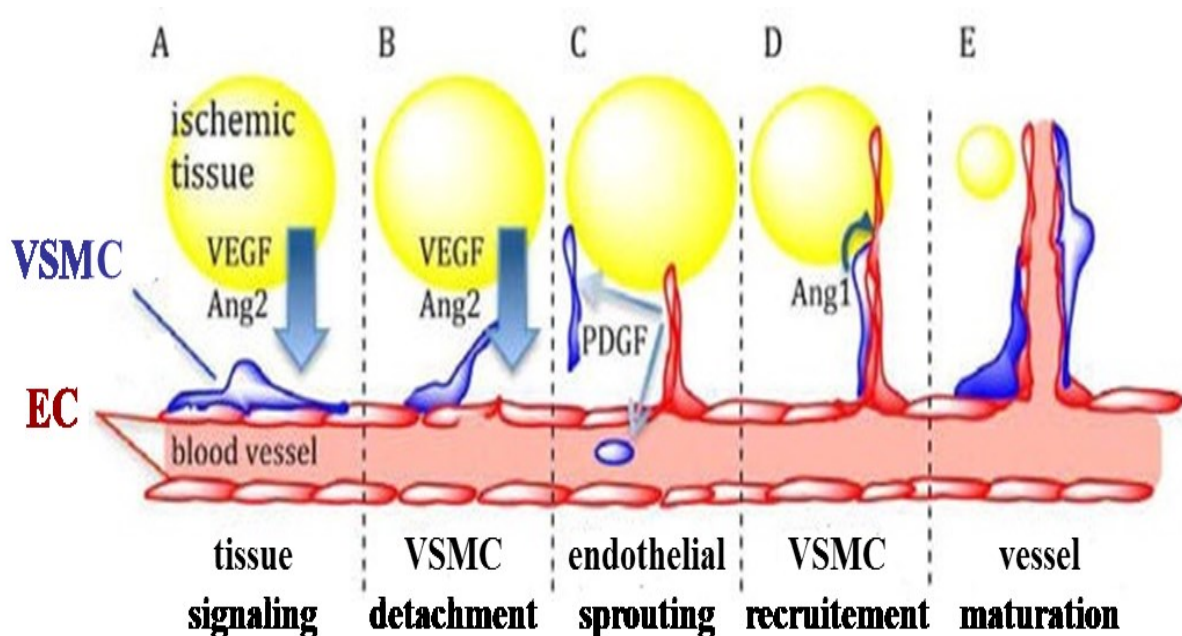


Figure 3 Rôle des facteurs de croissance dans l'angiogenèse post-ischémique

A. Le VEGF et l'Ang-2 sont sécrétés par le tissu ischémique indiquant ainsi la nécessité d'accroître la capacité sanguine. B. Ces facteurs de croissance perturbent les interactions CE-CMLV, entraînant le détachement des CMLV des CE, et le déplacement des CE vers le tissu ischémique. C. Ces CE sécrètent le PDGF-B qui recrute les CMLV à partir des tissus environnants. D. L'Ang-1, libérée par les CMLV, désactive le récepteur de l'Ang-2 et favorise les interactions EC-CMLV. E. Le vaisseau mature est ainsi formé et stabilisé (Figure adaptée de Brudno et al)³².

Les Ang sont des ligands pour les «Ties», des récepteurs à activité tyrosine kinase exprimés par les CE²⁷. L'Ang-1 est un facteur de croissance sécrété par les CMLV alors que l'Ang-2 est libérée par les CE⁵. Des études *in vivo* sur des embryons de souris déficients en Tie-2³³ ou son ligand Ang-1³⁴ ont montré leur rôle important dans les interactions CE-CMLV, dans l'angiogenèse et dans le maintien de l'intégrité structurale des vaisseaux. Par contre, la surexpression de l'Ang-2 chez les souris empêche la formation de vaisseaux sanguins dans les embryons, reflétant ainsi l'antagonisme naturel de l'Ang-1 et l'Ang-2 au cours du dialogue CE-CMLV³⁵.

Chez l'adulte, plusieurs molécules sécrétées par les CE diffusent vers les CMLV et régule la vasodilatation et les fonctions artérielles. Le monoxyde d'azote (NO) est un des facteurs majeurs impliqués dans la vasodilatation endothélium-dépendante (Figure 4)³⁶. L'homodimère PDGF-BB induit la relaxation NO-dépendante des vaisseaux comme l'a démontré Maejma *et al* chez les souris³⁷.

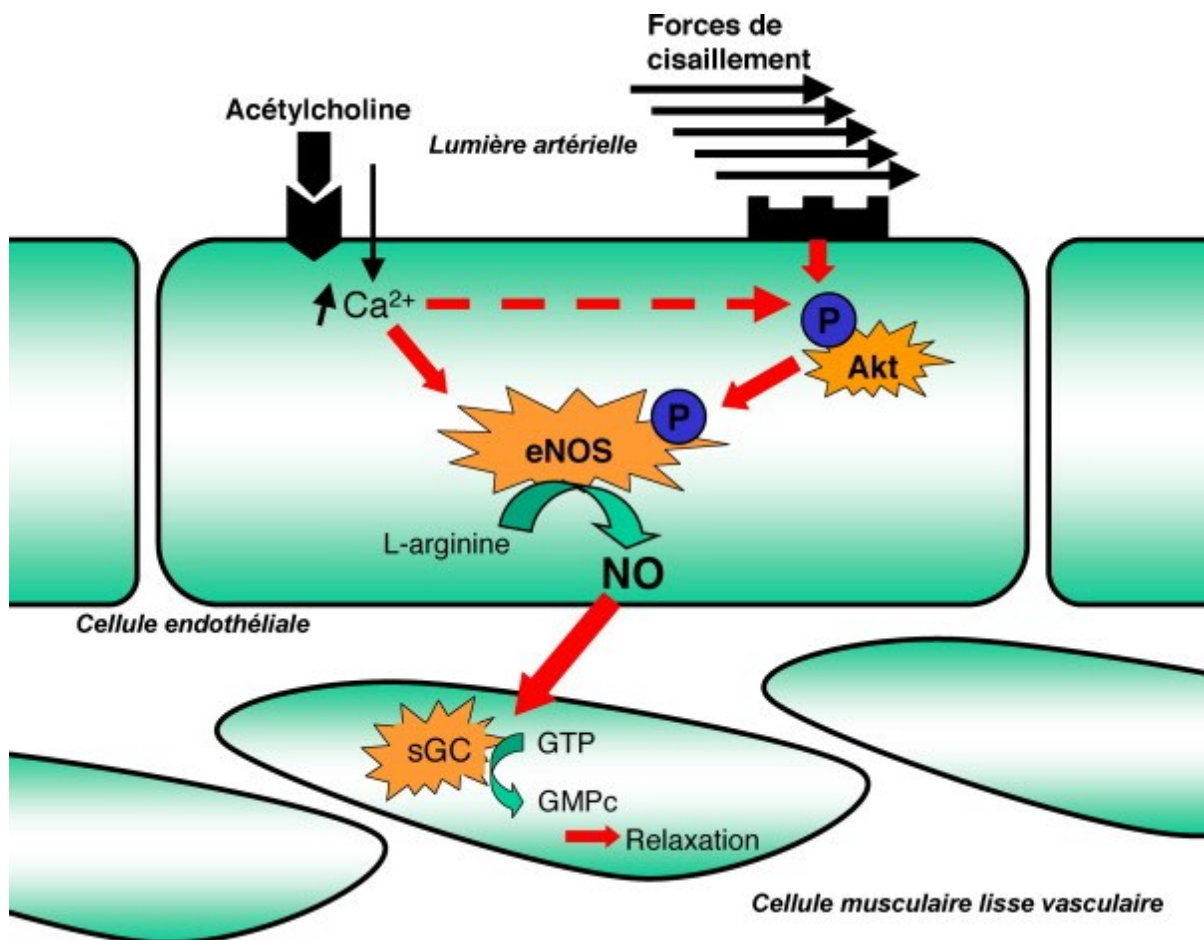


Figure 4: Régulation du tonus vasculaire par le NO

Dans les CE, la biosynthèse de NO à partir de la L-arginine se fait suite à l'activation de l'eNOS par des voies Ca^{2+} -dépendantes (acétylcholine) ou Ca^{2+} -indépendantes (stimulus mécanique). Le NO ainsi sécrété par les CE a une action paracrine sur les CMLV de la média du vaisseau où il induit la synthèse de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et la relaxation artérielle³⁶.

Les CE peuvent aussi induire une hyperpolarisation des CMLV par la libération des facteurs hyperpolarisants endothéliaux (EDHF). Cette hyperpolarisation se répand vite et engendre la vasodilatation de l'artère et l'augmentation du volume d'éjection⁴. Les epoxyeicosatrienoic acids (EET) qui sont des métabolites de l'acide arachidonique sont aussi sécrétés par les CE et entraînent une vasodilatation endothélium-dépendante³⁸. De plus, la prostaglandine I2 ou couramment nommée prostacycline (PGI2) contribue aussi à la vasodilatation endothélium-

dépendante. La PGI₂ produite par les CE se lie aux CMLV via son récepteur (IP) et accroît la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) qui à son tour stimule la protéine kinase A (PKA). La PKA entraîne la dilatation de l'artère en phosphorylant et bloquant la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK)^{3,39}. La synthèse de la PGI₂ est sous le contrôle de la cyclooxygénase-1 (COX-1)⁴⁰ (Figure 5)³.

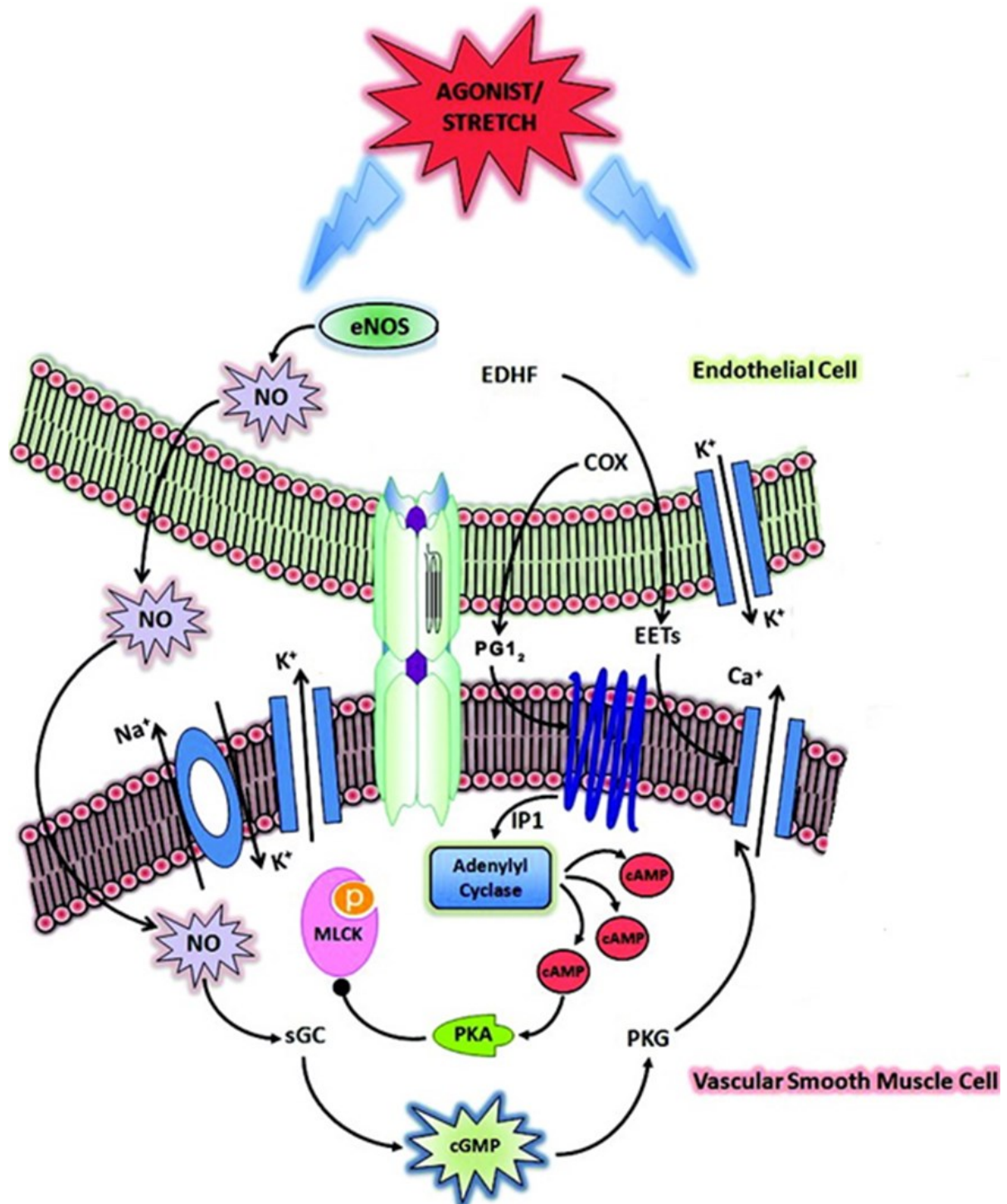


Figure 5: Représentation schématique récapitulative de la vasodilatation endothélium-dépendante

eNOS: endothelial nitric oxide synthase (Figure adaptée de Triggle et al)³.

Du fait de la proximité des CE et des CMLV, une communication indépendante du signal paracrine peut avoir lieu par contact physique entre les membranaires de ces cellules. Nous aborderons brièvement ce type d'interaction dans le paragraphe suivant.

➤ Interaction physique

La formation des vaisseaux et le maintien de la stabilité des vaisseaux matures nécessitent un contact physique entre les CE et les CMLV à travers plusieurs protéines (Figure 6)^{6,41}.

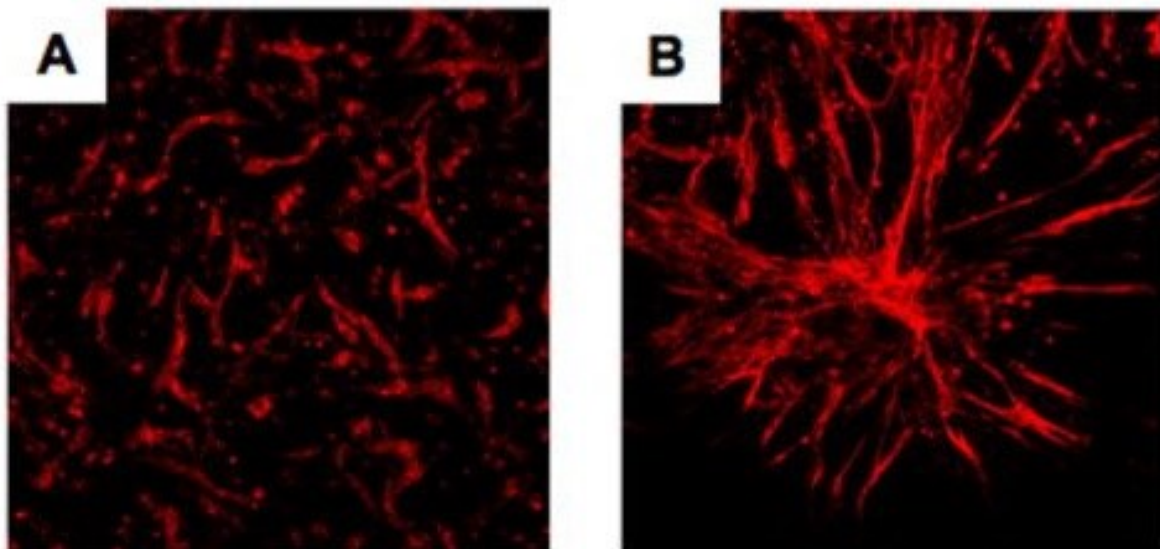


Figure 6: Modèle tridimensionnel de l'angiogenèse

A. Les CE sont cultivées seules. B. Les CE sont en co-culture avec des CMLV. La coloration à la lectine montre que l'angiogenèse réalisée par les CE est promue par la présence des CMLV, ce qui consolide l'importance des interactions CE-CMLV dans la formation et l'assemblage des vaisseaux (Figure adaptée de Liu et al)⁴¹.

Les CMLV présentent à leur surface des récepteurs Notch transmembranaires qui sont impliqués dans le développement des vaisseaux et dans la différenciation de ces CMLV⁴² suite

à l'interaction des Notch avec leurs ligands transmembranaires endothéliaux tels que les protéines «Delta-like»(DSL). La liaison Notch-DSL engendre un changement de la conformation de Notch. Les sites de clivage de la «A Disintegrin And Metalloproteinase» (ADAM) et de la γ -sécrétase ainsi dévoilés permettent la division de Notch en deux domaines. Le domaine intracellulaire (ICD) se dirige vers le noyau des CMLV où il active le signal Notch et la transcription ciblée, alors que le domaine extracellulaire (ECD) est pris en charge par les CE (Figure 7)⁴³.

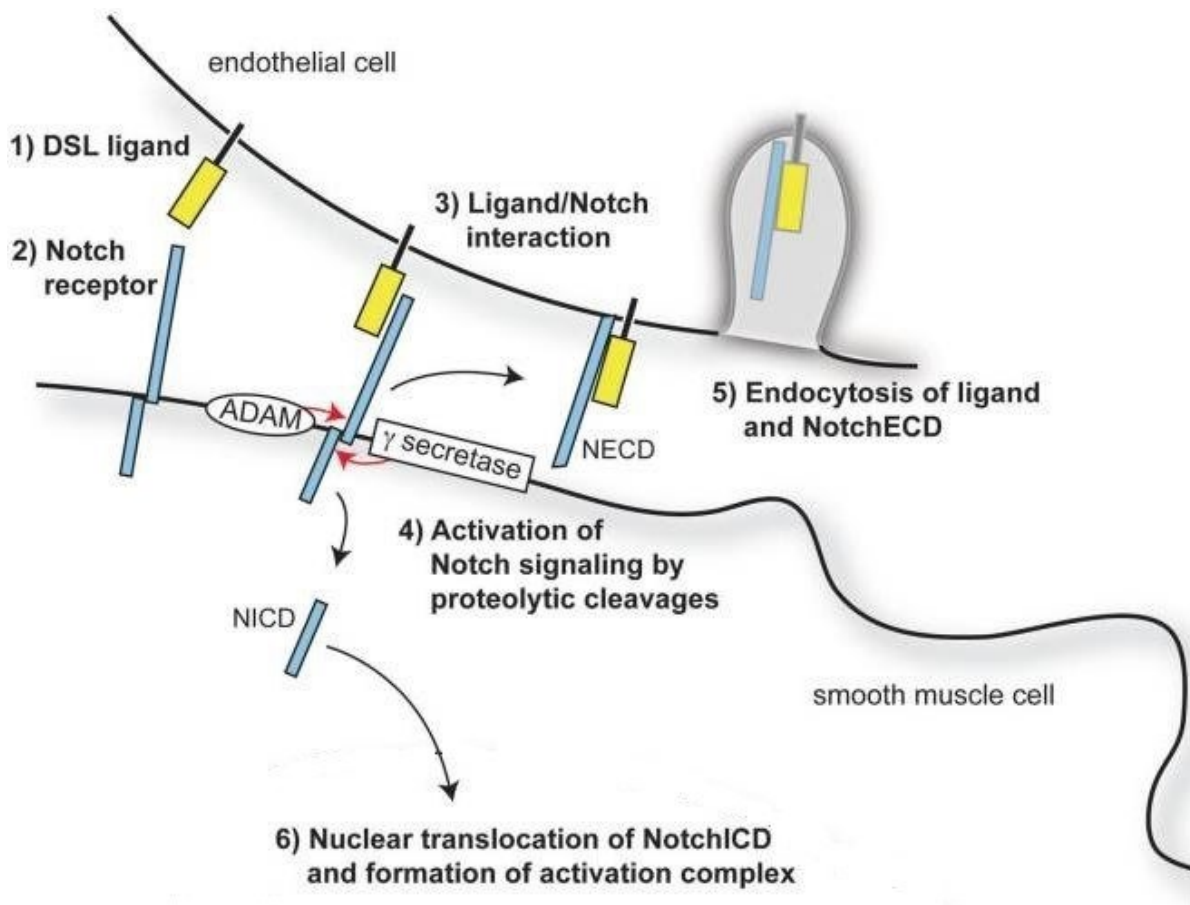


Figure 7: Contact CE-CMLV médié par Notch

(Figure adaptée de Boucher et al)⁴³.

Les connexines Cx43 et Cx45 sont d'autres protéines transmembranaires impliquées dans les interactions CE-CMLV. Ces Cx43 et Cx45 établissent des jonctions «gap» communicantes entre les CE-CMLV essentielles à la différenciation des CMLV au cours de l'embryogenèse suite à la stimulation du TGF- β , tandis que chez l'adulte, les connexines contrôlent le fonctionnement des vaisseaux^{6,44,45}.

Ainsi, le dialogue CE-CMLV est crucial pour l'assemblage, la stabilisation et le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des vaisseaux sanguins, que ce soit par des signaux paracrines ou par contact physique. La dérégulation de ce dialogue engendre des maladies diverses ; nous nous focaliseront sur l'hypertension artérielle et l'athérosclérose dans la partie suivante.

1.3. Dialogue CE-CMLV pathologique

1.3.1. Hypertension artérielle

➤ *Altération du signal paracrine*

L'hypertension artérielle est une maladie chronique très répandue qui constitue un des principaux facteurs de risque de morbidité et de mortalité. Elle est généralement définie comme une pression artérielle systolique supérieure à 140 mmHg et (/ou) une pression artérielle diastolique supérieure à 90 mmHg^{46,47}.

L'altération du signal paracrine NO entraînant un dysfonctionnement du dialogue CE-CML est l'un des mécanismes physiopathologiques bien décrits dans l'hypertension artérielle, en particulier au niveau pulmonaire (HTAP)⁴⁸. L'endothéline (ET) est l'un des facteurs

vasoconstricteurs sécrété par les CE^{3,4} qui antagonise les actions du NO⁴⁹. La famille des endothélines comprend l'ET1, l'ET2 et l'ET3. L'ET1 est produite par les CE et les CMLV présentent à leur surface deux récepteurs pour l'ET1: l'ETA et l'ETB. Les patients souffrant d'HTAP présentent une vasoconstriction liée au déséquilibre entre l'ETA et l'ETB. En effet, chez ces patients, l'ET1 exprimée de façon excessive se lie préférentiellement à l'ETA et exerce ses effets vasoconstricteurs par la libération du Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique des CMLV, et à travers la voie des protéines kinases associées à Rho (ROCK) qui phosphorylent la chaîne légère de la myosine la rendant sensible au signal Ca²⁺ intracellulaire, contractant par conséquent les CMLV^{50,51}. De même, l'ET1 induit le remodelage vasculaire à travers les voies des «mitogen-activated protein kinase» (MAPK) et ROCK⁵¹. En parallèle, les CE expriment le récepteur ETB de l'ET1, ce dernier agit d'une façon autocrine sur les CE en découplant l'enzyme de synthèse endothéliale du NO (eNOS) et en activant par la suite la synthèse de l'anion superoxyde O⁻ qui empêche l'effet vasodilatateur du NO (Figure 8)^{48,52}.

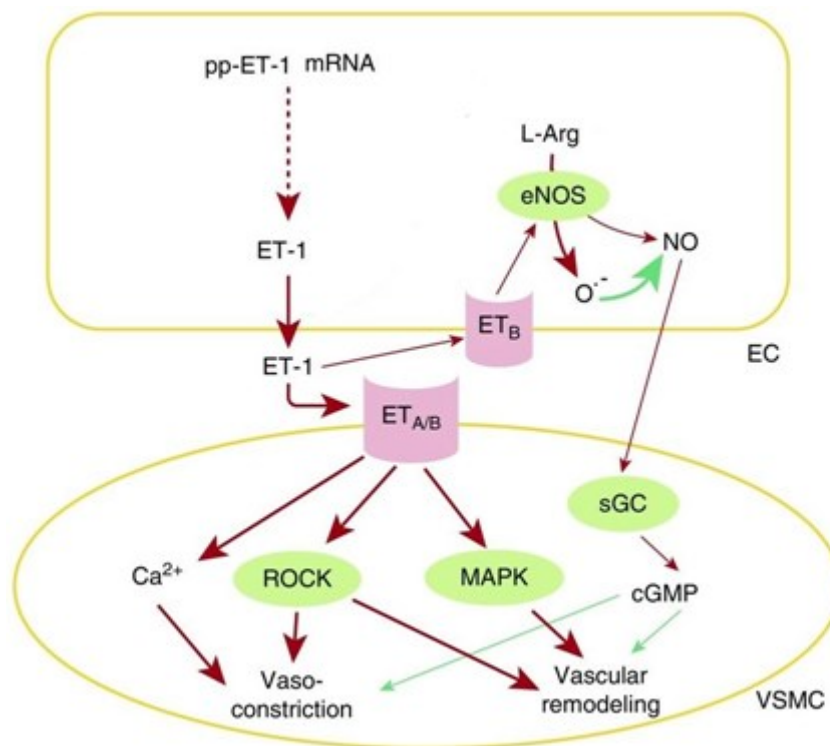


Figure 8: L'effet néfaste de l'ET1 sécrétée par les CE sur les CMLV

Les CMLV présentent à leur surface deux récepteurs pour l'ETI libérée par les CE; l'ETI se lie principalement à l'ETA et entraîne la vasoconstriction par la libération du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique des CMLV et à travers la voie des ROCK. De même, l'ETI induit le remodelage vasculaire à travers les voies MAPK et ROCK. En outre, les CE expriment le récepteur ETB de l'ETI, ce dernier agit d'une façon autocrine sur les CE et inhibe la synthèse et la biodisponibilité du NO qui est un puissant vasodilatateur et inhibiteur du remodelage vasculaire (l'activation est en rouge et l'inhibition en vert) (Figure adaptée de Gao et al)⁴⁸.

➤ **Altération du contact physique**

Les jonctions myoendothéliales communicantes (MEJ) jouent aussi un rôle dans l'hypertension artérielle. Les rats spontanément hypertendus présentent une plus grande incidence de MEJ dans les artères caudales que les rats normotendus, accompagnée d'une hypertrophie des CMLV⁵³. De plus, la culture *in vitro* des anneaux aortiques de rats hypertendus en présence d'inhibiteurs des MEJ a bloqué la contraction induite par les CE⁵⁴. Or les MEJ servent à transmettre des facteurs sécrétés par les CE aux CML, comme la sérotonine dont l'augmentation de sa production par l'hydroxylase du tryptophane 1 (Tph1) est impliquée dans la pathobiologie de l'HTAP⁵⁵⁻⁵⁸. Une fois à l'intérieur des CMLV, la sérotonine entraîne la libération du TGF β de sa liaison à la protéine de latence (LAP), permettant ainsi la fixation du TGF β à son récepteur «activin receptor-like kinase 5» (ALK5), ce qui transmet le signal de TGF β à l'intérieur des CMLV et induit le remodelage vasculaire à travers la phosphorylation des «small mothers against decapentaplegic» smad et MAPK^{56,59}. Outre son action sur le TGF β , la sérotonine active la production de l'anion superoxyde par les CMLV, et en concentration élevée, l'O $^{\cdot-}$ diffuse dans les CE par le biais des MEJ et réduit la biodisponibilité du NO atténuant ainsi ses effets vasodilatateurs et antiprolifératifs^{52,60}. Les MEJ peuvent servir ainsi comme acteurs dans l'hypertension artérielle (Figure 9)⁴⁸.

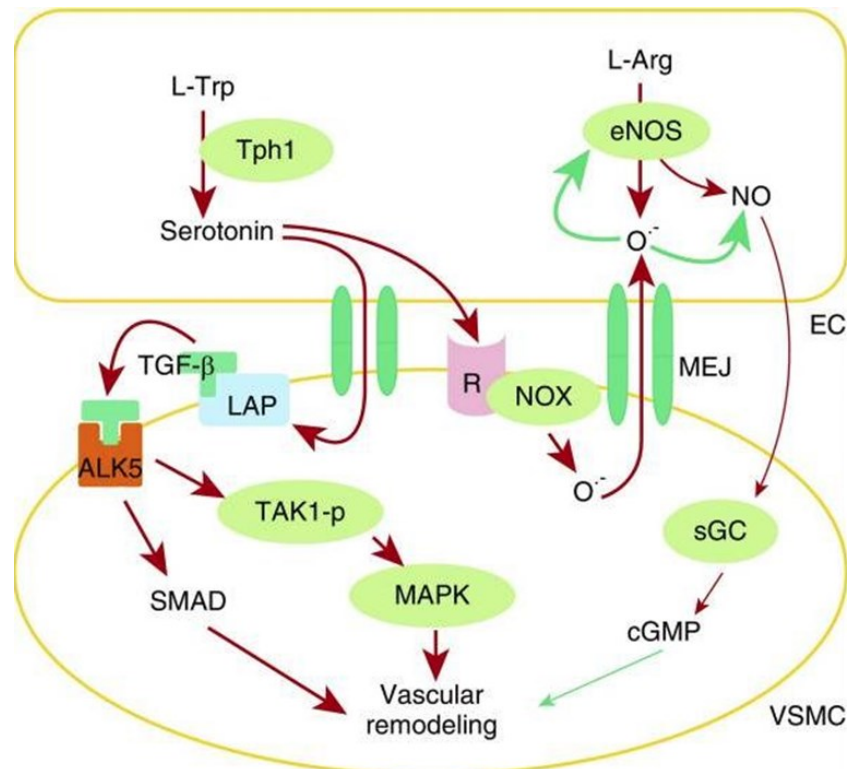


Figure 9: La sérotonine, transloquée à l'intérieur des CMLV par des jonctions communicantes, induit un remodelage vasculaire

La sérotonine sécrétée par les CE est transférée aux CMLV à travers des MEJ. Une fois à l'intérieur des CMLV, la sérotonine induit le remodelage vasculaire à travers les voies de smad et MAPK et par réduction de la biodisponibilité du NO d'origine endothéliale et de ses effets antiprolifératifs et vasodilatateurs GMPc-dépendants (l'activation est en rouge et l'inhibition en vert)⁴⁸.

Le déséquilibre entre les molécules vasoconstrictrices et vasodilatatrices, ainsi que la transmission d'un signal de remodelage vasculaire à travers des MEJ, débouchent en une hypertension artérielle⁴⁸. L'interaction CE-CMLV impliquée dans le développement de l'hypertension artérielle peut aussi favoriser d'autres pathologies comme l'athérosclérose que nous discuterons dans la partie suivante.

1.3.2. Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie artérielle systémique qui touche les artères de grandes et moyennes tailles⁶¹. C'est une maladie inflammatoire caractérisée par un dysfonctionnement endothélial, une infiltration leucocytaire, une prolifération des CMLV et une formation néointimale associée non seulement à une accumulation de lipides mais aussi à un dépôt de calcium⁶². La croissance d'une plaque d'athérosclérose rétrécit la lumière des vaisseaux sanguins et limite le flux sanguin tissulaire. L'obstruction de l'artère, localement ou à distance en cas de rupture de la plaque et embolisation dans une artère de plus petit calibre, conduit à une ischémie tissulaire et à un dysfonctionnement d'organe. C'est le mécanisme le plus fréquemment retrouvé dans l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral par exemples, maladies cardiovasculaires très fréquentes et responsables d'une morbi-mortalité élevée dans les pays développés (Figure 10)^{63,64}.

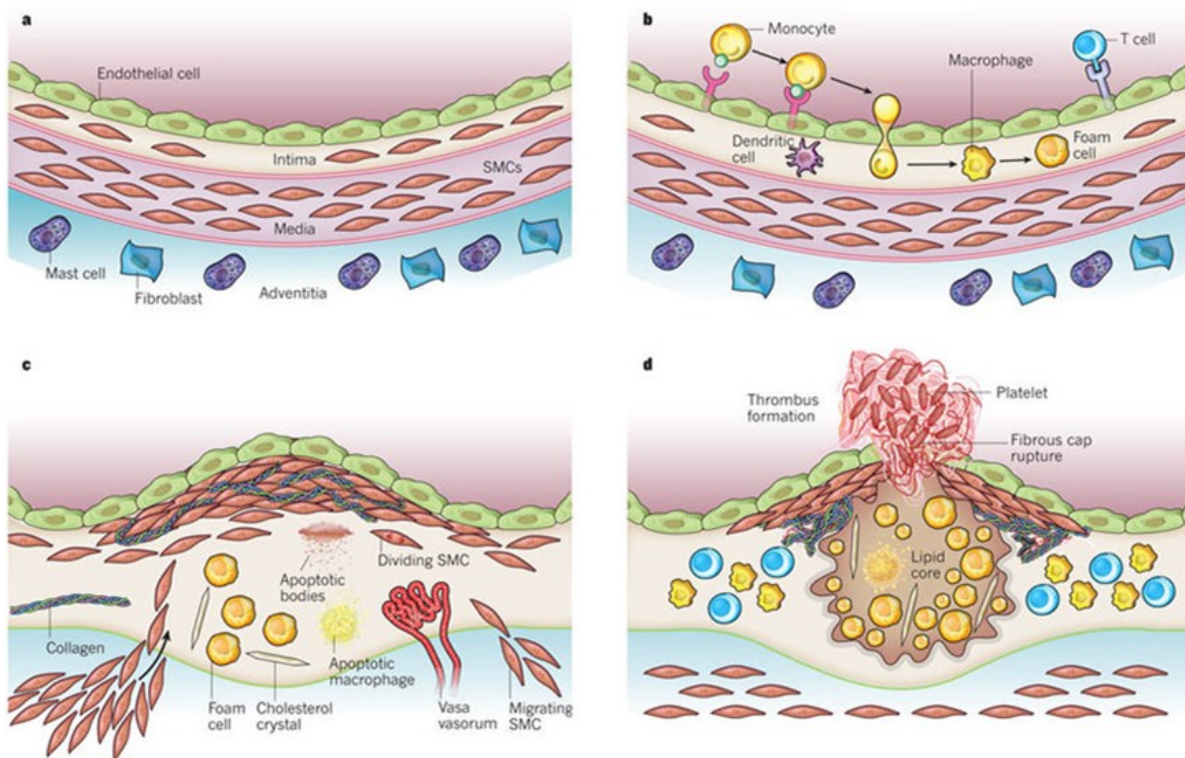


Figure 10: Développement de la lésion athérosclérotique

a) L'artère est formée par trois couches. La couche interne, ou intima, est bordée par une monocouche de CE en contact avec le sang et contient des CMLV résidentes. b) L'athérosclérose débute par l'adhésion des lymphocytes T et des monocytes aux CE en réponse à l'oxLDL suivie par l'infiltration des monocytes et leur maturation en macrophages. Ces macrophages absorbent des lipides et se transforment en cellules spumeuses. c) Les CMLV migrent de la média vers l'intima, où elles prolifèrent et synthétisent des macromolécules de la matrice extracellulaire. Les macrophages et les CMLV peuvent subir une apoptose et contribuer à l'accumulation lipidique et nécrotique. d) La plaque d'athérosclérose peut se rompre et libérer des facteurs pro-coagulants déclenchant la formation d'un thrombus dans la lumière du vaisseau⁶⁴.

L'athérosclérose est déclenchée par la perturbation de la structure et de la fonction endothéliales due à certains facteurs tels que le diabète et le stress oxydatif. Cette dysfonction endothéliale résulte en l'adhésion des lymphocytes T et des monocytes aux CE en réponse à l'oxLDL, suivie par l'infiltration des monocytes et leur maturation en macrophages tissulaires. Ces macrophages absorbent l'oxLDL et forment les cellules spumeuses. Or les cellules spumeuses sont incapables de décomposer l'oxLDL et subissent une nécrose qui contribue à l'accumulation lipidique et nécrotique dans l'intima. Le corps nécrotique contient des cytokines qui stimulent la migration des CMLV de la média vers l'intima, où elles prolifèrent et synthétisent des macromolécules de la matrice extracellulaire. La plaque d'athérosclérose ainsi formée peut devenir de plus en plus complexe avec la calcification⁶⁵. En effet, l'athérosclérose caractérisée par une perte progressive des CE résulte en une disponibilité réduite du NO produit par les CE⁶⁶. Or le NO inhibe la calcification et la transdifférenciation ostéogénique des CMLV par la voie de la GMPc en atténuant l'activité du TGF β mesurée par la phosphorylation du complexe smad2/3 et en réprimant l'expression des marqueurs ostéogéniques tels que l'ALP, l'ostéocalcine et le collagène de type 1, comme l'a montré Kanno *et al* chez des CMLV isolées de l'aorte thoracique des souris⁶⁷. Ce processus inflammatoire favorise ainsi la transdifférenciation ostéogénique des CMLV qui commencent à sécréter des protéines associées à la formation osseuse telles que le

collagène de type 1, l'ostéopontine (OPN), l'ostéonectine, l'ostéoprotégérine (OPG) et la protéine gla matricielle (MGP)⁶⁸. De plus, le dysfonctionnement des CE fournit un foci pour l'initiation de la calcification vasculaire (CV). Le facteur de nécrose tumorale α (TNF α) stimulé par l'apoptose des CE induit la production de la protéine morphogénétique osseuse 2 (BMP2) à partir des CE survivantes. La BMP2, qui est un puissant facteur de différenciation ostéogénique, favorise la régulation positive de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP), et des hautes concentrations de l'ALP dégradent et inactivent le pyrophosphate inorganique (PPi), un des plus puissants inhibiteurs de la formation d'hydroxyapatite⁶⁹. Dans une étude récente de Davenport *et al*, le ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B (RANKL) a augmenté la libération de BMP2 par les CE aortiques humaines; et la culture des CMLVH aortiques dans un milieu conditionné par les CE exposées au RANKL a stimulé l'expression et l'activité de l'ALP et l'expression de RUNX2, deux marqueurs ostéogéniques bien établis, chez les CMLVH. L'addition de l'inhibiteur connu de la BMP2, la Noggine, au milieu conditionné par les CE exposées au RANKL, a aboli les effets pro-ostéogéniques du milieu conditionné sur les CMLV, indiquant ainsi que la BMP2 sécrétée par les CE agit d'une manière paracrine pour induire la calcification et la transdifférenciation ostéogénique des CMLV (Figure 11)⁷⁰. En outre, une autre étude récente de Mikhaylova *et al* utilisant des CMLV isolées des souris a montré que la calcification *in vitro* des CMLV induite par la BMP4 est aggravée par la présence du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF)⁷¹.

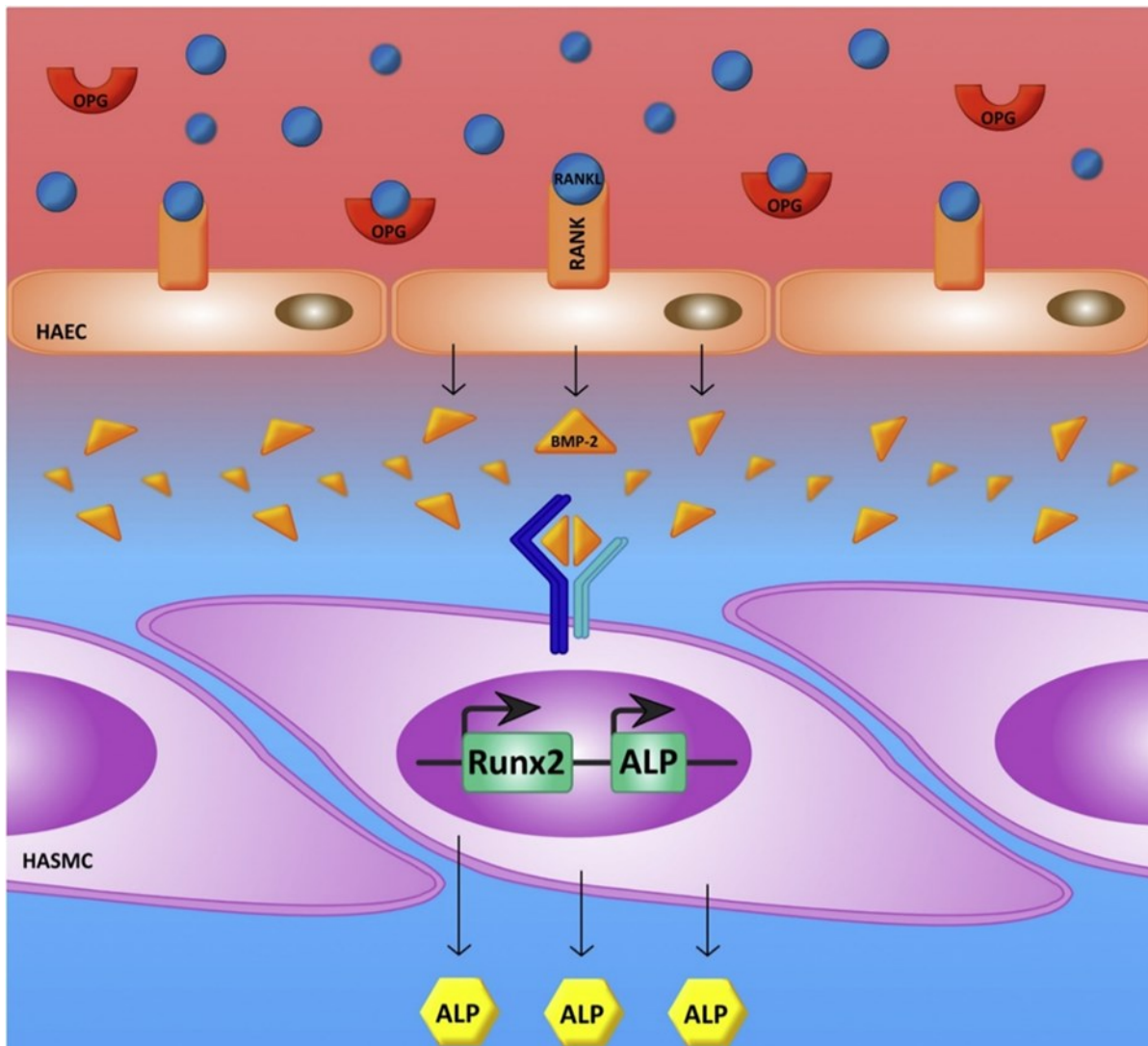


Figure 11 : Les CE sécrètent la BMP2 en tant que signal paracrine RANK/RANKL-dépendant

HAEC: human aortic endothelial cells, HASMC: human aortic smooth muscle cells⁷⁰.

Le dialogue CE-CMLV est impliqué aussi dans le développement de l'athérosclérose. Ce dialogue pourrait de plus participer à la formation des calcifications vasculaires. La calcification vasculaire fera l'objet du chapitre 2.

2. Calcification Vasculaire

2.1. Définition

La CV est le dépôt pathologique de sels de phosphate de calcium, sous forme d'hydroxyapatite, dans la paroi artérielle. La plupart des individus âgés de plus de 60 ans présentent une augmentation progressive du dépôt de calcium dans leurs principales artères (Figure 12)⁷.

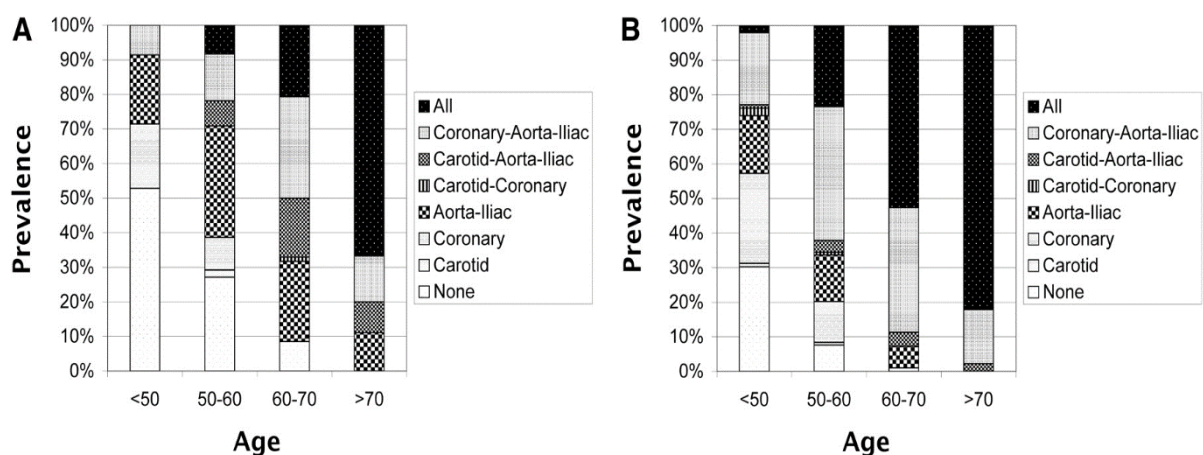


Figure 12: Prévalence des CV par groupe d'âge pour les femmes (A) et les hommes (B)

Des tomodensitométries par faisceau d'électrons ont été réalisées par Allison et al sur 650 sujets asymptomatiques pour évaluer les CV de l'aorte proximale et distale, la carotide, l'artère coronaire et les vaisseaux iliaques. L'âge moyen des sujets était de 57,3 ans et 53% étaient des hommes. 53% des femmes ne présentait pas de CV avant l'âge de 50 ans, contre 30% des hommes. Chez les deux sexes, la prévalence de l'absence de CV a diminué significativement jusqu'à la huitième décennie, quand aucun sujet n'a été trouvé exempt de CV⁷.

Cette calcification vasculaire réduit l'élasticité aortique et artérielle, ce qui altère l'hémodynamique cardiovasculaire, entraînant une morbidité et une mortalité importantes sous forme d'hypertension, de sténose aortique, d'hypertrophie cardiaque, d'ischémie myocardique, cérébrale ou des membres inférieurs, d'insuffisance cardiaque congestive⁸. La sévérité et

l'étendue de la minéralisation reflètent la charge de la plaque athérosclérotique⁷² et prédisent fortement et indépendamment la morbidité et la mortalité cardiovasculaires et la mortalité toutes causes confondues (Figure 13 et 14)^{9,10}.

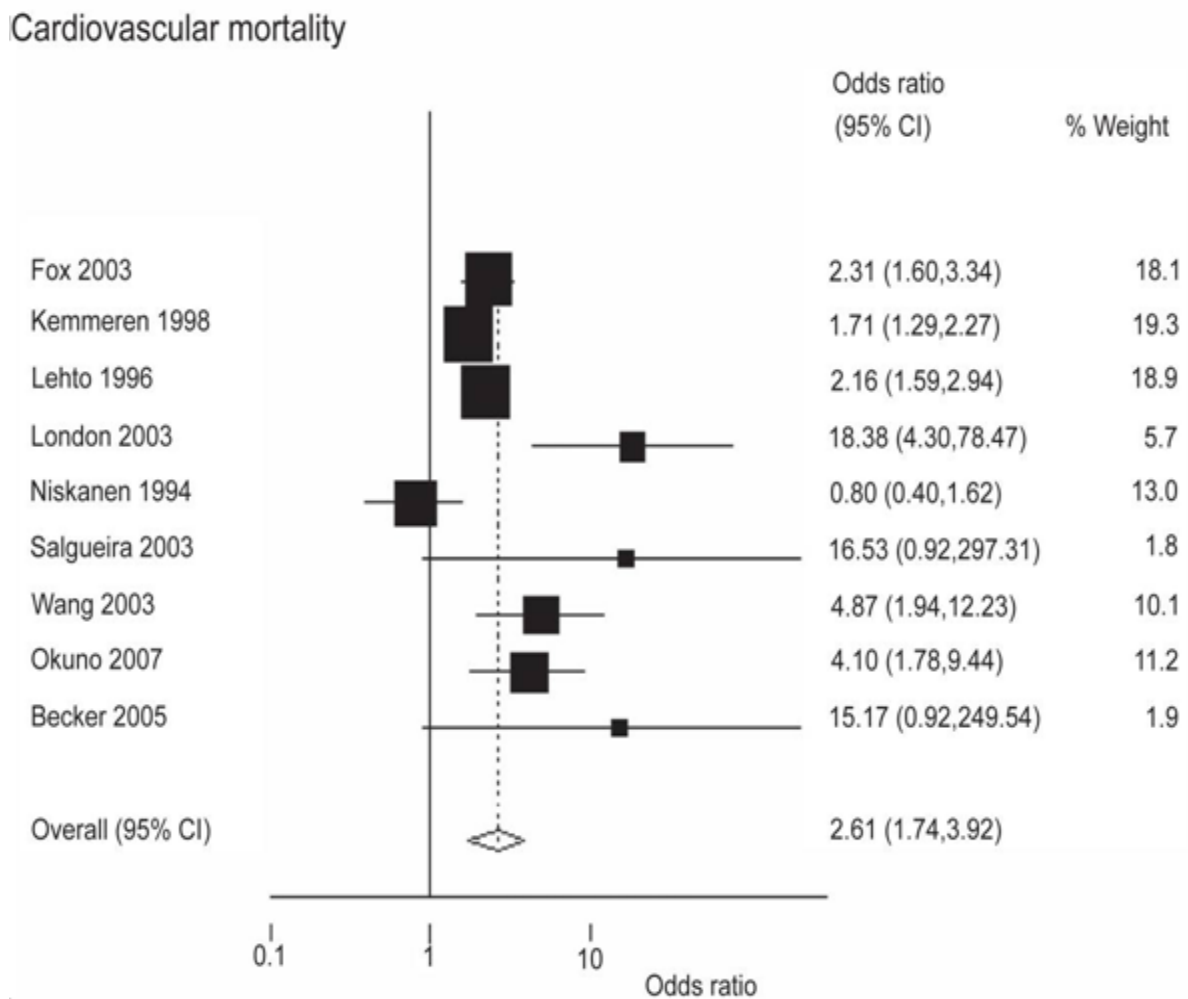


Figure 13: Ratios de la mortalité cardiovasculaire en présence de CV

Dans la méta-analyse faite par Rennenberg et al sur 9 études comportant 17 187 participants, un total de 1 356 décès cardiovasculaires a été observé. Parmi les 3657 sujets qui présentaient des calcifications, 718 décès cardiovasculaires ont été observés. Le ratio global pour la mortalité cardiovasculaire en présence de calcifications était de 3,94 par rapport à l'absence de calcifications¹⁰.

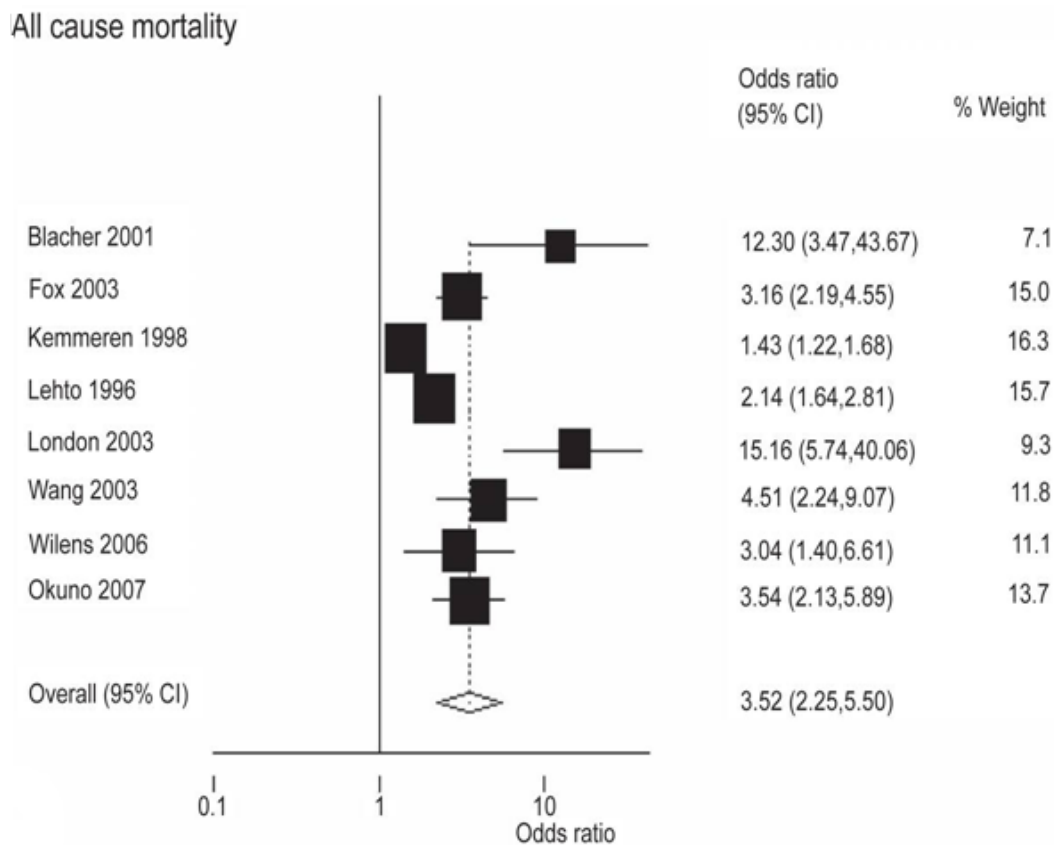


Figure 14: Ratios de toutes causes confondues de mortalité en présence de CV

Sur neuf études comportant 40 747 participants, un total de 3 821 décès a été rapporté par la méta-analyse de Rennenberg et al. Parmi les 16 528 sujets qui présentaient des calcifications, 1 589 décès ont été observés. Dans l'ensemble, le ratio global pour la mortalité toutes causes confondues en présence de calcifications était de 4,62 par rapport à l'absence de calcifications¹⁰.

Dans le passé, la CV a été considérée comme un processus passif, imminent et dégénératif impliquant des lésions athérosclérotiques avancées, cependant, des recherches récentes ont révélé de nombreuses similitudes avec des processus actifs et contrôlés se produisant dans le tissu osseux, dans lesquels les CE et les cellules mésenchymateuses et hématopoïétiques interagissent et répondent à des signaux mécaniques, inflammatoires, métaboliques et morphogénétiques gouvernant la minéralisation squelettique⁷³. Les facteurs de risque de la CV sont nombreux: l'hypertriglycéridémie, l'augmentation des LDL, la diminution des lipoprotéines de haute densité (HDL), l'obésité et l'hypertension. Il a été également démontré

que le diabète⁷⁴ et l'insuffisance rénale chronique (IRC) contribuent significativement à un risque plus élevé d'accumulation de dépôts de calcium dans la paroi vasculaire (Figure 15)⁷⁵.

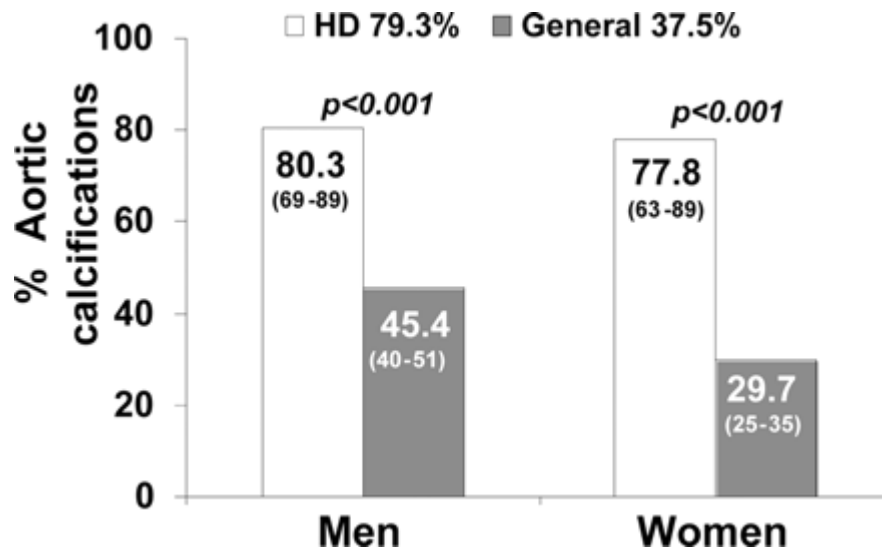


Figure 15: Prédiposition aux calcifications vasculaires chez les patients atteints d'IRC

Cannata-Andia et al ont démontré que le risque de calcifications aortiques était significativement plus élevé chez les hommes et chez les femmes qui étaient sous hémodialyse (HD)⁷⁶.

2.2. Types de calcification vasculaire

Cliniquement, il existe 4 types des calcifications cardiovasculaires: la calcification athérosclérotique, la calcification artérielle médiale, l'artériopathie urémique calcique et la calcification valvulaire cardiaque. Ces 4 types sont les conséquences de mécanismes pathologiques distincts mais qui peuvent se chevaucher et qui ne sont pas mutuellement exclusifs. En particulier, les calcifications athérosclérotiques et médiales se produisent fréquemment de concert, et puisque les couches intimale et médiale sont à proximité, les évaluations non invasives de la CV ne les distinguent généralement pas⁷⁷.

2.2.1. Calcification artérielle intimale

La calcification de l'intima artérielle, couramment appelée calcification athérosclérotique, est la forme la plus répandue des CV. Elle semble résulter de l'induction de la trans-différenciation ostéogénique des cellules vasculaires par des facteurs inflammatoires, tels que les oxLDL et les cytokines, présents dans la plaque athérosclérotique⁶⁴. Dans la majorité des études cliniques, la dyslipidémie est associée à la formation, l'intensité et la propagation de la CV^{78,79}. Ce type de calcification est entraîné par la nécrose cellulaire, l'inflammation et le dépôt lipidique qui augmentent la charge de la plaque athérosclérotique⁶⁴. La calcification athérosclérotique est donc associée à l'accroissement des plaques et des lésions occlusives et se développe chez les individus âgés. Elle se développe également chez les patients diabétiques, les patients ayant de longs antécédents de tabagisme, des taux élevés de cholestérol LDL et des taux élevés de protéine C-réactive. Elle est particulièrement accélérée au cours de l'IRC. Nous détaillerons les mécanismes mis en jeu dans l'IRC dans la partie 3.2 de ce travail.

2.2.2. Calcification artérielle médiale

La calcification artérielle médiale est définie par un dépôt phosphocalcique dans la couche médiale des vaisseaux sanguins entraînant la rigidité et la perte d'élasticité des vaisseaux (Figure 16)⁸⁰, indépendamment d'un processus d'athérosclérose.

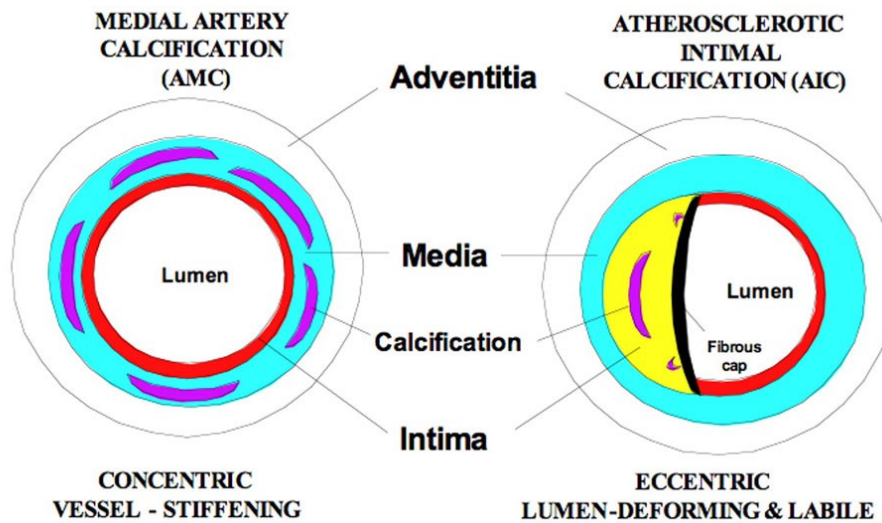


Figure 16: Les différences entre la calcification artérielle médiale et athérosclérotique

Les coupes transversales des artères montrent les différences dans la distribution spatiale des CV au niveau du média (panneau de gauche) ou de l'intima (panneau de droite), mettant en évidence la nature concentrique et rigide des vaisseaux atteints de calcification médiale et la nature excentrique avec des déformations occlusives de la lumière des vaisseaux atteints de calcification intimale⁸⁰.

Le dépôt phosphocalcique medial est le plus souvent observé chez les patients atteints de diabète⁸¹ et d'IRC⁸². Dans le diabète, l'hyperglycémie et les produits de glycosilation engendrent la transdifférenciation ostéogénique des CMLV et la calcification de la média via la voie de la BMP-2⁸³. La calcification médiale est associée à un risque accru d'amputation des membres inférieurs en raison d'une insuffisance vasculaire⁸⁴. Elle favorise l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque en réduisant notamment la compliance vasculaire et en augmentant les résistances périphériques totales⁸⁵. Le rôle de l'IRC dans le développement des CV médiales est détaillé dans le paragraphe 3.2.

2.2.3. Artériopathie urémique calcique

L'artériopathie urémique calcique ou anciennement appelée calciphylaxie est le troisième type de CV. Elle affecte les artères de moyennes et petites tailles et les artérioles et le dépôt des sels phosphocalciques se fait au niveau de la média d'une manière diffuse. Les patients atteints d'IRC sont les plus à risque de développer ce type de CV, mais le diabète et l'obésité sont d'autres facteurs de risque. La calciphylaxie s'accompagne de la prolifération de l'intima, la fibrose, l'occlusion de la lumière du vaisseau et la formation de thrombus ce qui entraîne la nécrose de la peau, du tissu sous-cutané, et des organes^{86,87}.

2.2.4. Calcification valvulaire cardiaque

La calcification des valves cardiaques est une maladie progressive caractérisée par un processus de calcification actif et un épaissement des feuillets valvulaires qui aboutit en une réduction sévère du débit sanguin (Figure 17)⁸⁸. Plusieurs facteurs de risques sont corrélés avec le développement de la sclérose des valves cardiaques et leur calcification, tels que l'obésité, l'hypertension, l'IRC et le stress oxydant entre autres⁸⁹. La calcification valvulaire est due à des stress mécaniques et à l'inflammation. En effet, les macrophages, mastocytes et lymphocytes B et T infiltrent suite à des lésions endothéliales. La calcification fait appel à une ostéogenèse et à un remodelage du tissu ossifié, mis en évidence par la présence de BMP2, BMP4, RUNX2 (runt-related transcription factor 2) et osteocalcine^{90,91}. Sans tenir compte des facteurs de risques, la calcification valvulaire peut être, en soi, prédictive de la mort par événement cardiaque⁹².

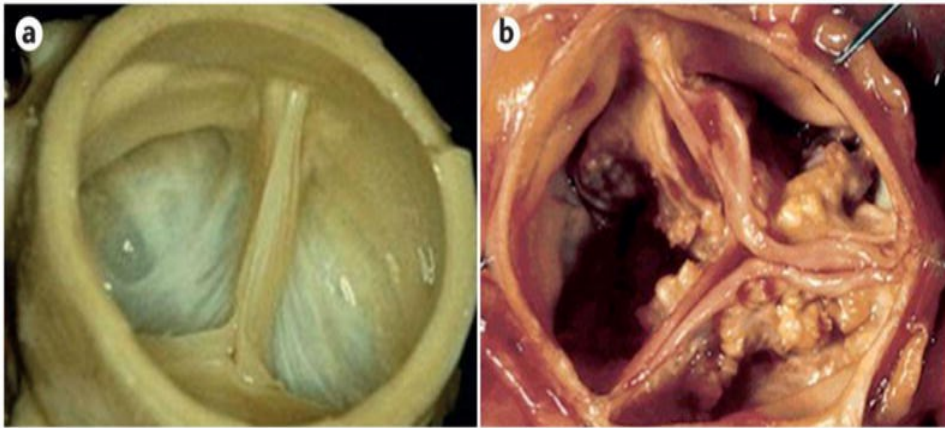


Figure 17: Photographies d'une valve aortique normale (a) et calcifiée (b)

(Figure adaptée de Lindman et al)⁸⁸.

2.3. Liens entre calcifications squelettique et vasculaire

L'os est un tissu minéralisé, composé d'une matrice organique renforcée par des dépôts de cristaux de phosphate de calcium sous forme d'hydroxyapatite. La matrice organique est composée de fibres de collagène de type I (environ 95%), de protéoglycanes et de nombreuses autres protéines (5%). Cette matrice organique, calcifiée par des minéraux de phosphate de calcium, intègre des cellules osseuses qui participent au maintien et à l'organisation de l'os, à savoir les cellules ostéoprogénitrices, les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes⁹³.

Des preuves morphologiques d'une métaplasie cartilagineuse et d'une ossification ectopique associée à une calcification artérielle médiale sévère et à une athérosclérose ont été observées en microscopie optique par Qiao *et al* (Figure 18)⁹⁴.

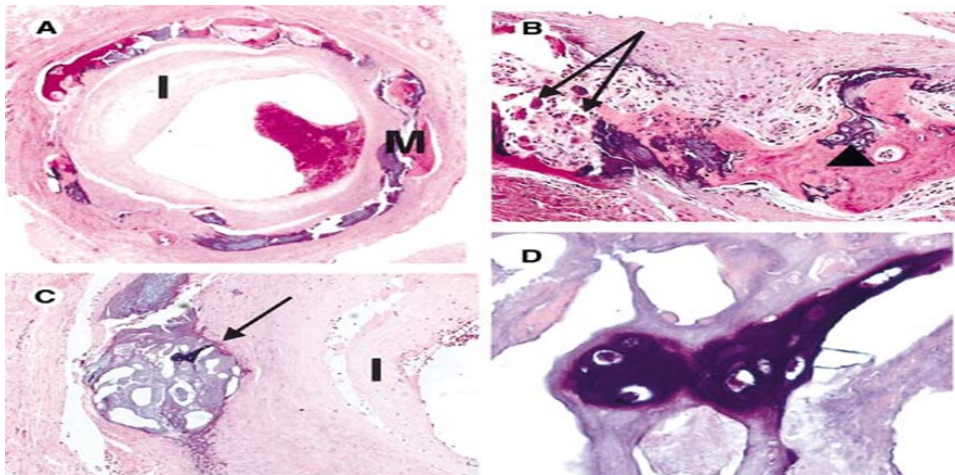


Figure 18: Métaplasies osseuse et cartilagineuse dans les calcifications artérielles médiales

(A) Vue à faible grossissement des calcifications artérielles de l'intima (I) et de la média (M) et métaplasie osseuse (Hématoxyline et éosine, grossissement original (G)×40). (B) Vue à Gx100 des chondrocytes dans une matrice basophile (tête de flèche) et des ostéoclastes multinucléés (flèches) dans des régions de métaplasie osseuse. (C) Une autre artère avec une plaque intimale (I) et un foyer de cartilage (flèche) au niveau du média (G×40). (D) Vue à Gx100 montrant des chondrocytes dans les lacunes (Figure adaptée de Qiao et al)⁹⁴.

De plus, les CMLV et les ostéoblastes partagent un précurseur commun de développement; qui est la cellule souche mésenchymateuse. Cette origine commune peut faciliter la transdifférenciation des CMLV en cellules ostéogéniques en réponse à une variété de stimuli, tels que l'augmentation des taux sériques de calcium et de phosphate inorganique (Pi), l'accumulation de lipides et les réponses inflammatoires. Cela entraînerait l'induction de voies de signalisation pro-ostéogéniques sous le contrôle des BMP (Figure 19)¹¹, ou en présence de l'oxLDL comme dans l'athérosclérose¹².

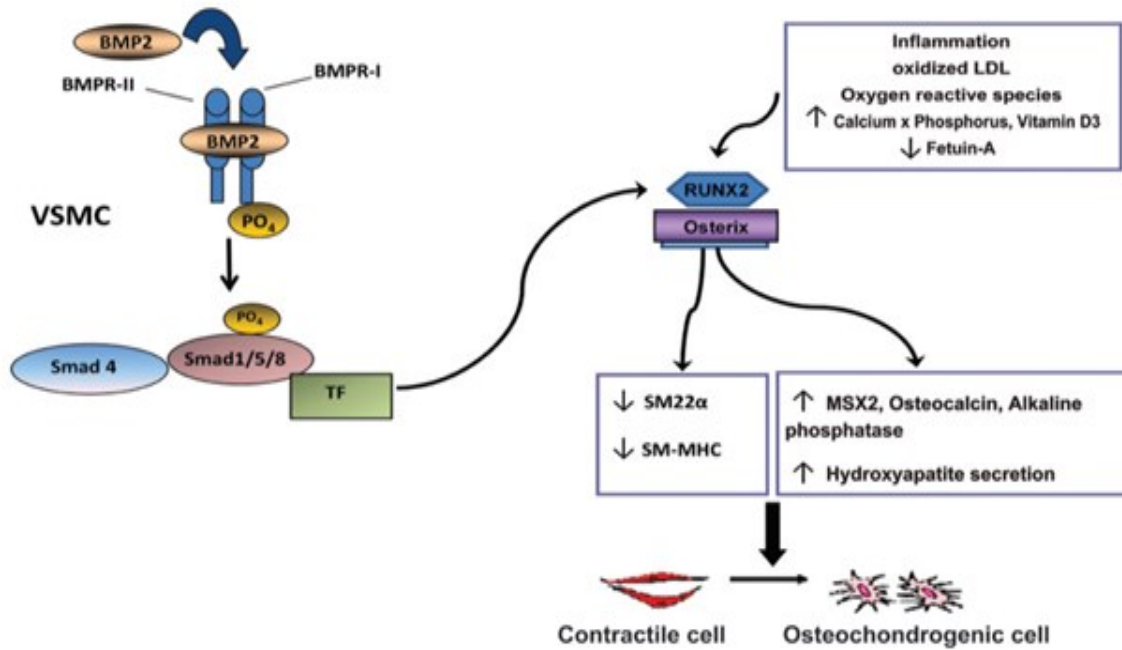


Figure 19: Transdifférenciation des CMLV en cellules ostéogéniques résultant en CV

Dans les CMLV, la signalisation BMP2 favorise la sécrétion d'hydroxyapatite. Les médiateurs inflammatoires, les espèces réactives de l'oxygène (ERO), les formes oxydées des lipoprotéines de basse densité (oxLDL), le phosphore, la vitamine D3, ainsi que la diminution de fetuin A constituent d'autres inducteurs de la trans-différenciation ostéogénique des CMLVs et de la CV¹¹.

Comme dans les tissus squelettiques, les dépôts de calcium vasculaire sont aussi sujets au remodelage et à la régression⁹⁵. En utilisant l'imagerie par tomographie par faisceau d'électrons, il a été montré que le traitement avec des inhibiteurs de l'HMG-CoA reductase, abaissant la lipidémie, diminue les dépôts calcifiés dans les artères coronaires⁹⁶. En outre, dans un modèle de rats où la calcification des artères était provoquée par un régime surdosé en vitamine D, une régression de 75% de la CV a été observée après 9 semaines d'arrêt du traitement au calcitriol. Cette régression était associée aux monocytes qui sont étroitement apparentés aux ostéoclastes responsables de la résorption osseuse⁹⁷. Le potentiel d'une thérapie de régression des calcifications vasculaires basée sur l'induction d'ostéoclastes ciblant le système vasculaire reste à explorer.

2.4. Pathogenèse des CV

Les CV se font par des processus similaires à ceux de la minéralisation du tissu osseux et les dépôts phosphocalciques sont observés dans l'intima et la média des parois vasculaires. La présence de protéines matricielles impliquées dans le contrôle de la biominéralisation a été mise en évidence dans les vaisseaux calcifiés⁸⁶. Cette minéralisation est le produit d'un ou plusieurs mécanismes différents. L'un des mécanismes est la perte d'inhibiteurs constitutivement exprimé par les vaisseaux sains tels que la MGP et la fétuine A (Fet A) qui induit une CV spontanée et augmente la mortalité. L'induction de la formation osseuse par transdifférentiation ostéogénique des CMLV, mise en évidence par l'expression de protéines osseuses telles que l'OPN, l'ostéocalcine (OCN) et la BMP2 dans les lésions vasculaires calcifiées, constitue un autre mécanisme de CV^{90,91}. La CV peut aussi résulter de la libération et la circulation de complexes de nucléation lors du remodelage osseux. Le dernier mécanisme est la mort cellulaire, par apoptose ou nécrose, fortement associée avec l'athérosclérose, où les débris membranaires riches en phospholipides et les corps apoptotiques servent comme foci pour la nucléation de l'hydroxyapatite (Figure 20)⁹⁸. Les déterminants moléculaires responsables de la transdifférenciation ostéogénique, et la perte de l'inhibition seront détaillés dans la partie suivante.

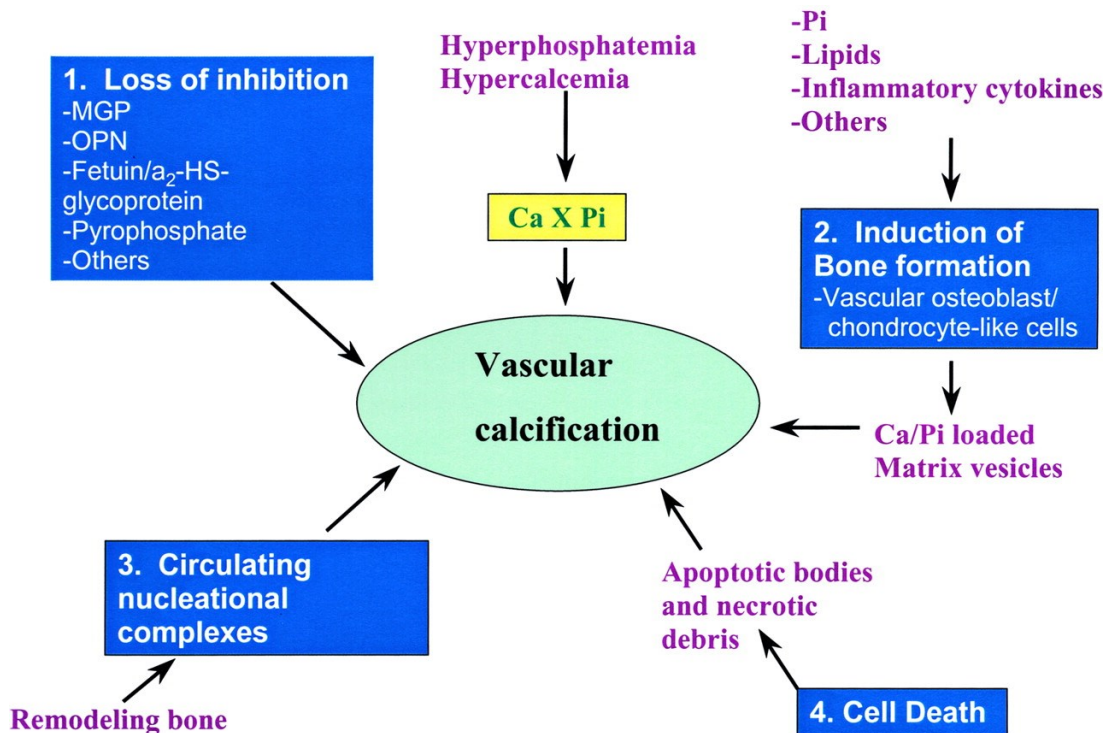


Figure 20: Représentation schématique des mécanismes de CV

1. Perte d'inhibiteurs, circulants ou constitutivement exprimés par les cellules résidentes, conduit à un dépôt d'hydroxyapatite. 2. Transdifférenciation ostéogénique des CMLV. 3. Remodelage actif de l'os libère des complexes de nucléation circulants. 4. La mort cellulaire conduisant à la libération de corps apoptotiques ou de débris nécrotiques qui peuvent constituer des foci de calcification⁹⁸.

2.4.1. Induction de la transdifférenciation ostéogénique

➤ BMP2

Le BMP2 appartient à la plus grande sous-classe de la famille des TGFβ; il est sécrété sous forme d'un monomère de 18 kDa et est impliqué dans la formation osseuse et dans les CV. Son récepteur est un complexe hétérodimérique formé de deux sérine/thréonine kinase qui, une fois lié à BMP2, phosphoryle smad1/5/8. Après leur libération du récepteur, les smad phosphorylés s'associent à Smad4 et ce complexe se transloque dans le noyau et induit l'expression des facteurs de transcriptions ostéogéniques tels que RUNX2^{99,100}. Cependant, BMP-2 peut agir

indépendamment des smad en inhibant les microARN-30b et 30c qui régulent la transcription de RUNX2¹⁰¹.

BMP2 a été détecté dans des CMLV humaines calcifiées¹⁰⁰, et son inhibition empêche la transdifférenciation ostéogénique et la formation osseuse *in vivo* et *in vitro*, protégeant ainsi contre les CV¹⁰².

➤ **RUNX2**

En aval de la signalisation médiée par BMP2 se trouve le facteur de transcription ostéogénique RUNX2 également nommé Cbfa1 (core-binding factor alpha 1)¹⁰³. RUNX2 est un facteur essentiel pour le devenir et la différenciation des lignées ostéoblastiques dès l'embryogenèse et pour la formation de la matrice extracellulaire osseuse par augmentation de l'expression de l'ALP, du collagène de type 1 et l'ostéopontine entre autres (Figure 21)¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Dans un modèle de souris transgéniques n'exprimant pas RUNX2, il n'y a pas eu de formation osseuse ou cartilagineuse, et des ostéoblastes fonctionnels n'ont pas été trouvés non plus¹⁰⁷. L'expression de RUNX2 dans les CMLV est un marqueur précoce de la transdifférenciation ostéogénique. Chez les patients atteints d'IRC et hémodialysés, RUNX2 a été spécifiquement exprimé dans les vaisseaux calcifiés¹⁰⁸. Des concentrations élevées en Pi peuvent induire l'expression de RUNX2¹⁰⁹.

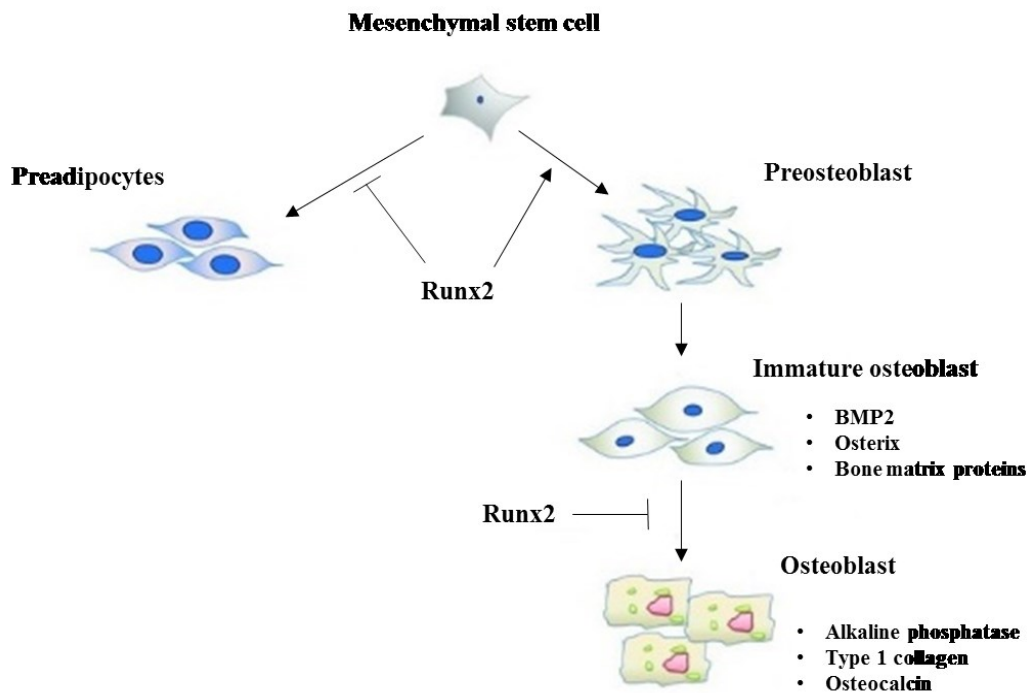


Figure 21: La différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes

Les cellules mésenchymateuses acquièrent un phénotype ostéoblastique sous l'effet de RUNX2. En effet, RUNX2 inhibe la différenciation des cellules mésenchymateuses en préadipocytes et oriente leur différenciation en préostéoblastes. Les ostéoblastes immatures expriment les protéines de la matrice osseuse et la BMP2, et se développent en ostéoblastes matures. L'ALP est l'une des protéines précoces exprimée par les ostéoblastes et impliquée dans la minéralisation osseuse (Figure adaptée de Zhang et al)¹⁰⁶.

➤ La phosphatase alcaline (ALP)

L'ALP est l'une des protéines précoces exprimée par les ostéoblastes et impliquée dans la minéralisation osseuse. Du fait que l'ALP est associée aux dépôts de la matrice extracellulaire, l'activité ALP est considérée comme un marqueur de la CV. Dans l'hypophosphatasie, une maladie héréditaire caractérisée par un développement anormal des os et des dents en raison de déficit de minéralisation, le gène ALP contient une mutation faux-sens¹¹⁰. Cette activité ALP est indispensable aux dépôts d'hydroxyapatite au cours de la formation osseuse, elle pourrait avoir une action semblable au cours de la CV. Durant la CV, les CMLV expriment fortement

l'ALP¹¹¹. De même, l'activité ALP des CMLV est stimulée par la BMP2, l'oxLDL et les autres facteurs déclenchant la calcification athérosclérotique. L'ALP agit en diminuant l'expression du PPi qui est un fort inhibiteur de la CV^{107,112}.

2.4.2. Perte de l'inhibition

En plus des inducteurs de l'ostéogenèse, la CV peut être initiée par une perte d'expression des inhibiteurs des calcifications osseuse et ectopique, démontrée par plusieurs modèles de souris transgéniques MGP, Fet A ou OPN qui présentent de vastes calcifications des tissus mous^{113,114}.

➤ MGP

La MGP est une protéine γ -carboxylée de 14 kDa exprimée par les chondrocytes, les CMLV et les cellules endothéliales, se trouve dans l'os et dans les plaques athérosclérotiques^{103,115}. La MGP est un puissant inhibiteur de la minéralisation de la matrice extracellulaire et le déficit en MGP chez l'homme entraîne une calcification anormale des tissus mous appelée syndrome de Keutel. Son rôle en tant qu'inhibiteur de CV a été démontré chez les souris MGP-nulles qui développent de vastes calcifications artérielles et meurent sous deux mois^{113,116}. La MGP sous forme γ -carboxylée se lie à la BMP2 pour empêcher la différenciation ostéogénique des CMLV¹¹⁷. Des anticorps spécifiques à la conformation, et l'immunohistochimie ont démontré que la forme γ -carboxylée de la MGP est associée aux calcifications de l'intima et de la média, alors que la forme non γ -carboxylée est rencontrée dans les fibres d'élastine de la couche médiane des vaisseaux sains¹¹⁸. De plus, la MGP se lie à l'hydroxyapatite et empêche la progression de la minéralisation¹¹⁹.

➤ **Fet A**

La Fet A ou glycoprotéine $\alpha 2$ -Heremans-Schmid, est un inhibiteur systémique circulant de la CV. La Fet A est produite par le foie et se lie à Ca^{2+} pour empêcher la formation des cristaux d'hydroxyapatite¹²⁰. Une étude faite sur 312 patients hémodialysés a montré que la concentration sérique de Fet A est plus basse que chez les individus sains, et cette diminution est inversement corrélée à la concentration sérique de la protéine C-réactive, et est associée à une mortalité accrue¹²¹. Dans le modèle de souris Fet A-nulle, des calcifications des tissus mous ont été observées dans les reins, la langue et la peau (Figure 23)¹¹⁴.

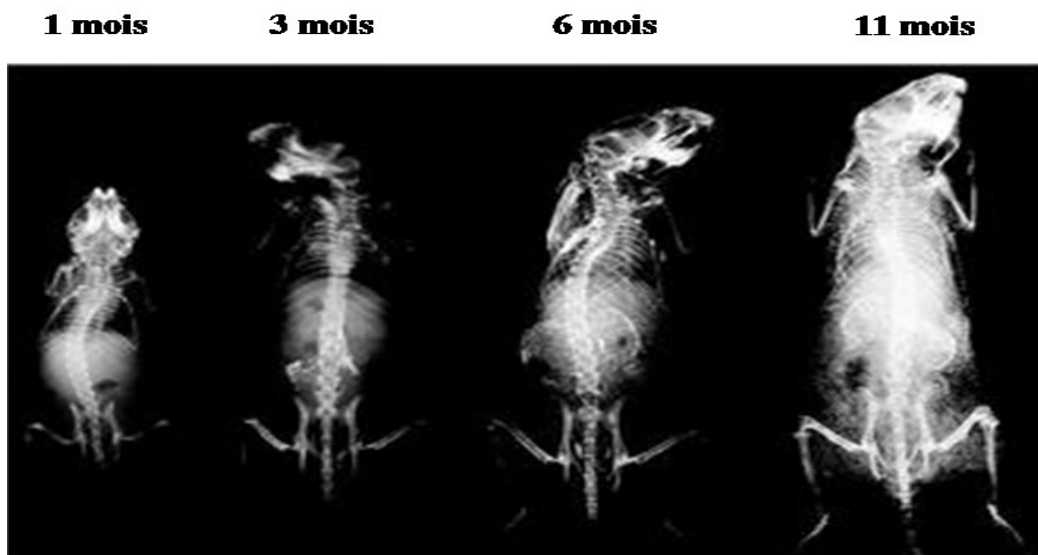


Figure 22: Radiographie des souris Fet A-nulles

Des calcifications des tissus mous sont observées chez les souris Fet A-nulles (Figure adaptée de Schafer et al)¹¹⁴.

➤ OPN**a) Définition**

L'OPN est une protéine qui appartient à la famille de petits ligands de l'intégrine, glycoprotéines N-liées (SIBLING)¹²². Elle a été initialement identifiée dans les ostéoblastes comme une protéine modulatrice de la minéralisation de la matrice¹²³. L'OPN a été identifiée aussi comme une protéine impliquée dans plusieurs processus d'inflammation aiguë et chronique, tels que la cicatrisation, la fibrose, les maladies auto-immunes et la calcification athérosclérotique¹²⁴. L'OPN est aussi impliquée dans la migration, l'infiltration et l'immunité cellulaires, ainsi que dans l'angiogenèse, l'inhibition de la mort cellulaire et la reconstitution des matrices extracellulaires lors des métastases tumorales¹²⁵.

b) Structure et synthèse de l'OPN

L'OPN humaine est un polypeptide monocaténaire (314 acides aminés), ayant un poids moléculaire approximatif de 32 kDa, codé par un gène constitué de sept exons et situé sur le quatrième chromosome (4q13)¹²⁶. Les modifications post-traductionnelles de l'OPN comprennent la phosphorylation par une Serine/Thréonine (Ser/Thr) kinase et l'addition de chaînes de sucre, suivies d'une sécrétion par la cellule¹²⁷. La transcription est accélérée par des facteurs de croissance tels que le TGF- β , le TNF α , l'EGF, l e PDGF, le bFGF et les cytokines IL-1 α et IL-2, LIF1, l'endothéline, l'acide rétinoïque, et la concanavaleine A. L'OPN adhère aux cellules via son motif Arginine-Glycine-Acide aspartatique (RGD) et agit comme une cytokine pour favoriser la migration et le potentiel de croissance des macrophages, des lymphocytes, des CE et des CMLV¹²⁸. L'OPN possède une séquence peptidique de 16aa du côté N-terminal, des sites de phosphorylation Ser/Thr et un motif Glycine-RGD-Sérine très flexibles¹²⁹. D'autres

séquences Sérine-Valine-Valine-Tyrosine-Glycine-Lysine-Arginine adjacentes au motif RGD interagissent avec les intégrines impliquées dans l'induction de l'inflammation. En outre, l'OPN se lie également à un récepteur de l'acide hyaluronique, le CD44, d'une manière indépendante du RGD, et induit la chémotaxie des macrophages et l'engagement des récepteurs $\beta 3$ -intégrines. D'autre part, l'OPN est clivée par plusieurs métalloprotéases matricielles telles que MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 et MMP-12, à des sites adjacents ou à l'intérieur des sites de liaison des intégrines (Figure 23)¹³⁰. L'OPN peut également interagir avec les composants structurels de la matrice extracellulaire. L'OPN contient deux domaines N-terminaux conservés, avec une homologie de liaison à l'héparine, qui sont susceptibles de réguler sa liaison aux protéoglycanes d'héparane de sulfate. De plus, l'OPN se lie directement à la fibronectine¹³¹ et au collagène type 1¹³².

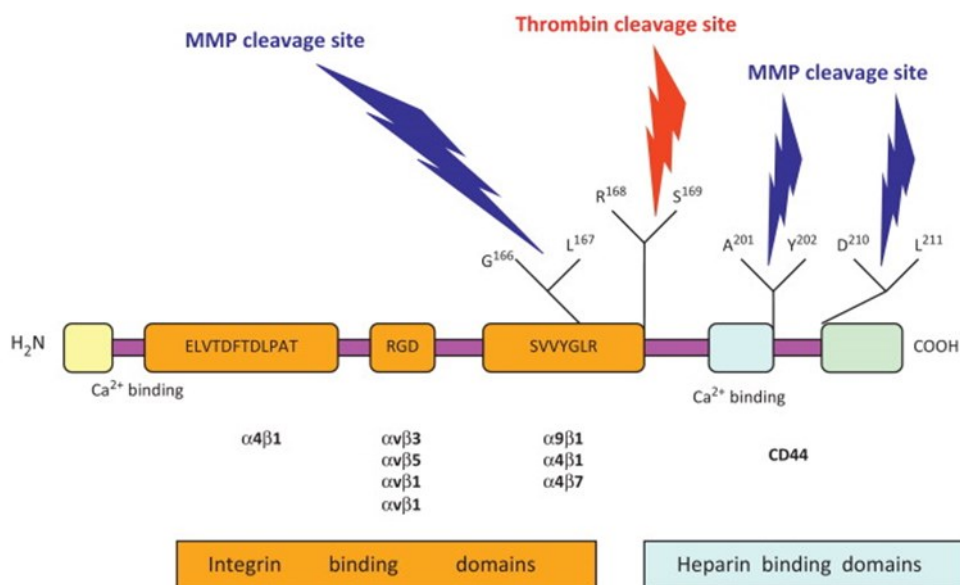


Figure 23: Structure protéique de l'OPN

L'OPN humaine comprend 314 acides aminés. Elle possède des sites de clivage de la thrombine et des MMP. De plus, elle contient un motif RGD et une séquence SVVYGLR pour les liaisons avec les intégrines, et un site de liaison au calcium¹³⁰.

c) Sources Cellulaires

L'OPN est exprimée et sécrétée dans divers tissus et cellules, y compris le cerveau, le foie, le tractus gastro-intestinal, les poumons, les os, les tissus cardiaques, les articulations et les reins. En outre, elle se trouve dans une variété de fluides biologiques, y compris le sang, l'urine et le lait¹³³. Pendant la cicatrisation ou dans des conditions pro-inflammatoires, l'expression de l'OPN est spécifiquement augmentée à proximité des cellules inflammatoires. L'OPN est produite sous forme de cytokine dans les lymphocytes T activés¹³⁴ et les macrophages¹³⁵, ce qui suggère que l'OPN joue un rôle important dans la modulation de l'inflammation. Ainsi, l'OPN influencerait l'inflammation, l'athérosclérose, la calcification vasculaire et jouerait un rôle essentiel dans la progression des maladies vasculaires.

d) Rôle de l'OPN dans la CV

L'OPN est présente dans les plaques athérosclérotiques humaines mais est absente dans les artères saines¹³⁶. Dans les lésions athérosclérotiques humaines, l'OPN est exprimée par les CMLV, les CE et les macrophages¹³⁷. L'activation du gène de l'OPN dans l'endothélium en régénération induit un épaississement de la couche médiale et une augmentation de la formation néointimale¹³⁸. De nombreuses études soutiennent l'idée que l'OPN participerait activement à la formation de la plaque d'athérosclérose. L'OPN augmente le recrutement des monocytes et régule la production de cytokines dans ces cellules lors de l'inflammation¹³⁹. Cependant, en plus de la fonction pro-inflammatoire, l'OPN empêche les dépôts ectopiques de calcium et est une puissante inhibitrice inductible de la CV (Figure 24)¹²⁸.

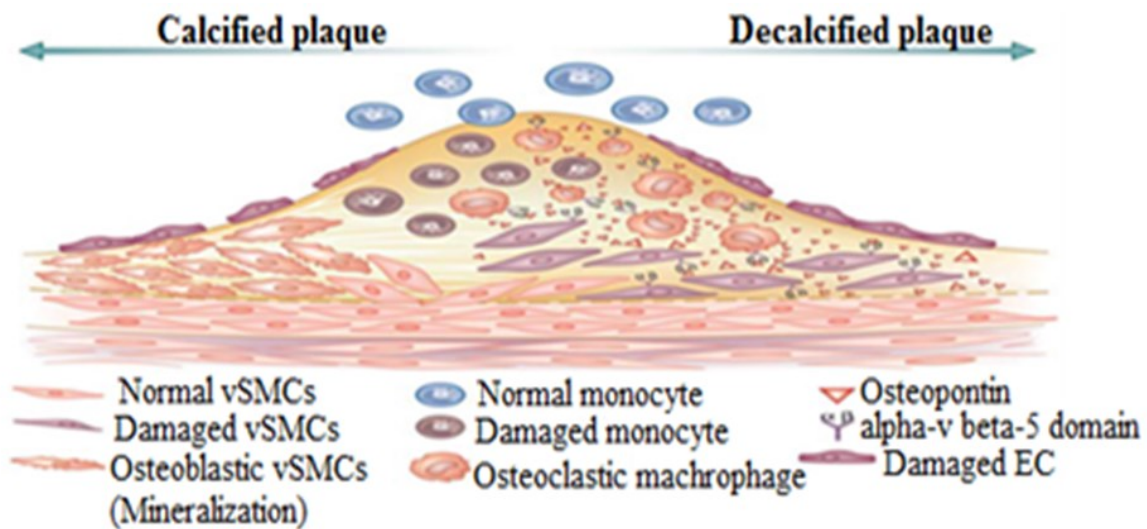


Figure 24: La décalcification des plaques athérosclérotiques par l'OPN¹²⁸

Le déficit en OPN dans les CMLV n'a pas conduit à une calcification dans les conditions de culture normales, mais il a augmenté significativement cette calcification dans un environnement riche en phosphate en fonction de la durée du traitement et de la concentration de phosphate. Ceci suggère une réponse adaptative des CMLV à la concentration environnante de phosphate¹⁴⁰. Au cours de l'IRC, l'hyperphosphatémie serait associée à une augmentation de l'expression de l'OPN dans les CMLV¹⁴¹. Chez les patients atteints d'IRC, les concentrations sériques d'OPN seraient significativement plus élevées par rapport aux sujets sains et ont été corrélées avec l'indice de calcification aortique¹⁴². En outre, l'OPN a été abondamment exprimée dans les lésions athérosclérotiques des tissus aortiques et ceci en lien avec le degré des plaques athéromateuses¹⁴³. Le Pi et les toxines urémiques activent l'expression de l'OPN dans les CMLV, ce qui semble être une réponse protectrice contre l'augmentation de la calcification lors de l'IRC, limitant ainsi l'étendue de la CV^{144,145}.

Néanmoins, la fonction biologique de l'OPN est étroitement liée à son statut de phosphorylation puisque la phosphorylation de l'OPN est requise pour l'inhibition de la calcification induite par

les CMLV, tandis que les effets promoteurs de l'OPN sur les EC surviennent avec l'OPN non phosphorylée (Figure 25)¹⁴⁶.

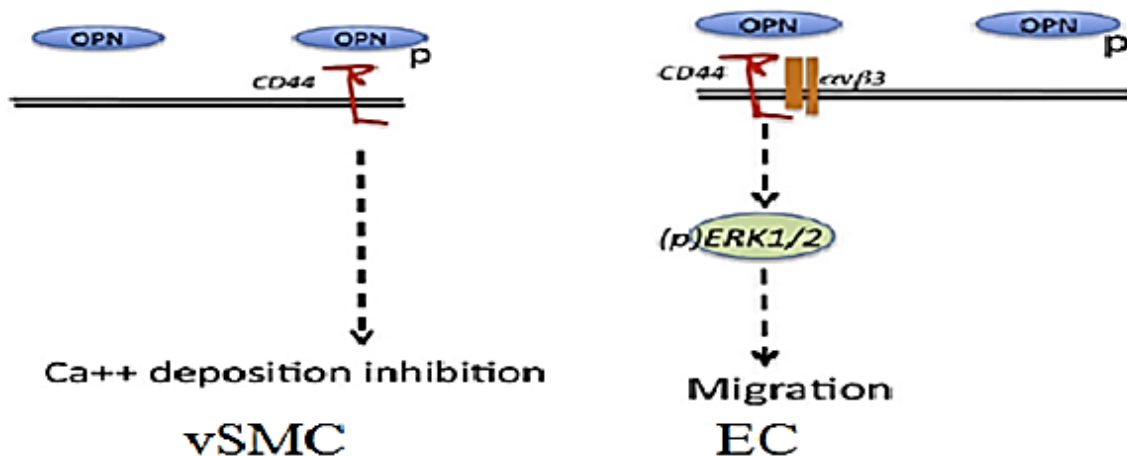


Figure 25: Représentation schématique de l'effet OPN et p-OPN sur les CMLV et les CE

p-OPN inhibe la calcification des CMLV en se liant exclusivement à CD44. L'OPN induit une migration des CE par l'intermédiaire de la voie ERK1/2 par l'intermédiaire de CD44 et $\alpha V\beta 3$. Ainsi, l'effet net de l'OPN dépend de son état de phosphorylation¹⁴⁶.

En résumé, les CV résultent d'un déséquilibre entre les inducteurs et les inhibiteurs de l'ostéogenèse (Figure 26)¹⁰⁷. Ce déséquilibre est plus prononcé dans certaines maladies telles que l'athérosclérose, le diabète, le vieillissement, et l'IRC¹⁰⁷. Cette dernière fera l'objet du chapitre 2.

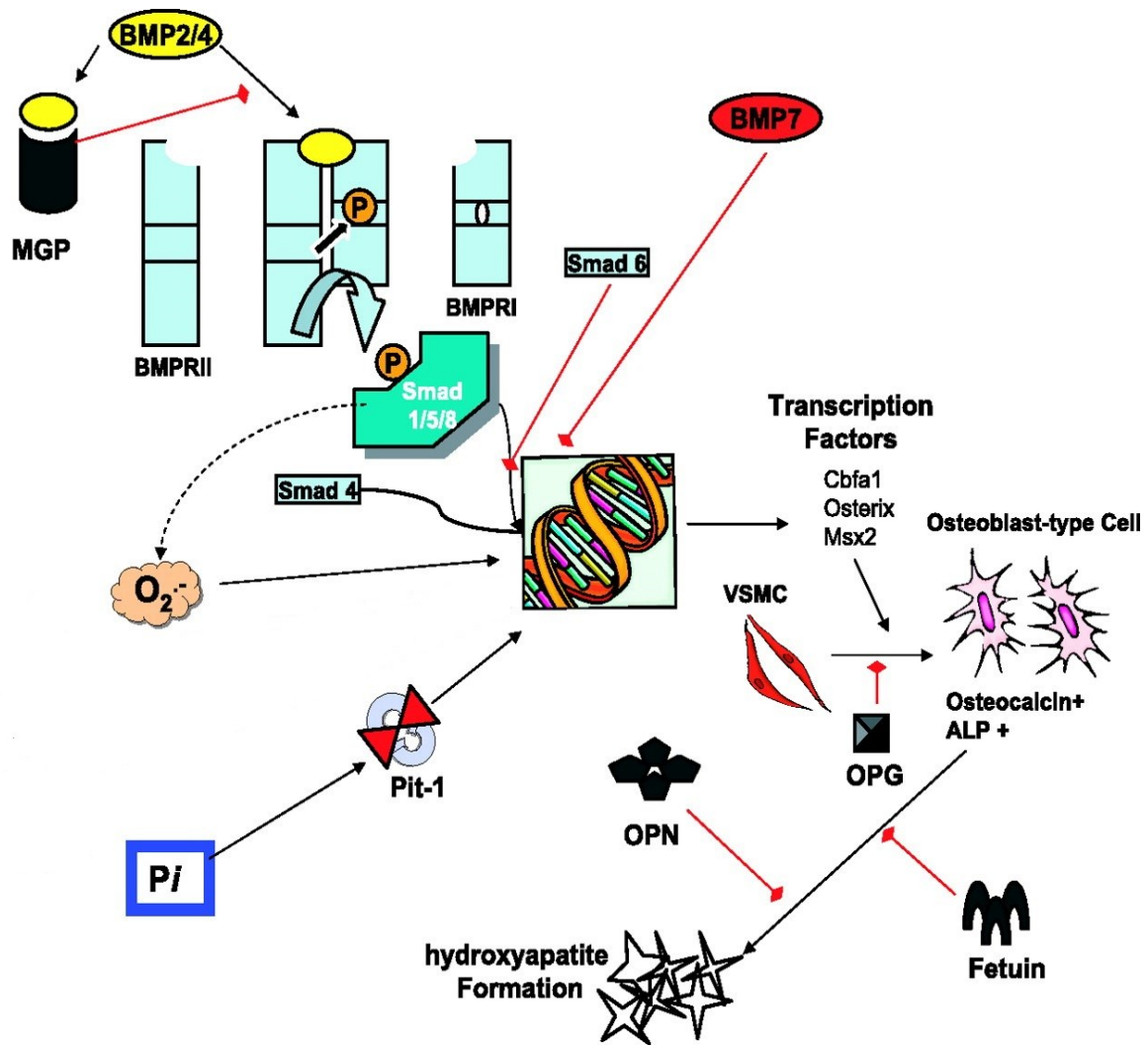


Figure 26: Représentation schématique récapitulative des déterminants moléculaires de la transdifférenciation ostéogénique

Les BMP2/4 augmentent l'expression des facteurs de transcription ostéogéniques tels que *Msx2*, *ostérix* et *RUNX2*; ce dernier est aussi induit par les espèces réactives de l'oxygène, la *smad4* et les concentrations élevées en *Pi*. En parallèle, la perte d'inhibiteurs tels que tels que la *Fet A*, *OPG*, *OPN* contribuent à la transdifférenciation ostéogénique des CMLV. Une fois les CMLV ont acquis un phénotype ostéogénique, elles commencent à exprimer l'ALP et à former des dépôts d'hydroxyapatite. Par contre, la *MGP* et *Smad6* bloquent la cascade ostéogénique de BMP2 et BMP4 et sont essentiels à l'inhibition des calcifications ectopiques (Figure adaptée de Johnson et al)¹⁰⁷.

3. Insuffisance Rénale Chronique

3.1. Généralités

3.1.1. Définition

L'IRC est généralement définie par un faible débit de filtration glomérulaire (DFG), ou par une fonction rénale réduite accompagnée d'albuminurie¹⁴⁷. Selon les directives de la Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, la réduction du DFG doit être observée sur plus de trois mois et un des deux critères suivants doit être retrouvé:

- Un dysfonctionnement rénal, structural ou fonctionnel, associé ou non à une diminution du DFG, dépisté histologiquement, ou par des tests sanguin ou urinaire, ou par imagerie.
- Un $DFG < 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$, sachant que le DFG physiologique est de $125 \text{ mL/min/1,73m}^2$ chez l'homme et de 115 chez la femme^{147,148}.

Actuellement, L'IRC est définie par une vitesse de déclin progressif de la fonction rénale supérieure à la vitesse de perte rencontrée habituellement avec le vieillissement seulement, estimée par le DFG^{147,149}.

3.1.2. Prévalence

La prévalence est le nombre de cas d'une maladie dans une population à un moment donné, englobant aussi bien les cas nouveaux que les cas anciens. Selon le rapport annuel du Réseau Épidémiologique et Information en Néphrologie (REIN) établi en 2015, la prévalence nationale en France était de 1232 cas par million d'habitants (pmh), avec un nombre global de 82295 patients atteints d'IRC au stade terminal et sous traitement.

La prévalence augmente fortement avec l'âge et particulièrement chez les hommes où elle augmente exponentiellement. La prévalence est significativement plus faible chez les femmes et cet écart est observé dès l'âge de 20 ans (Figure 28).

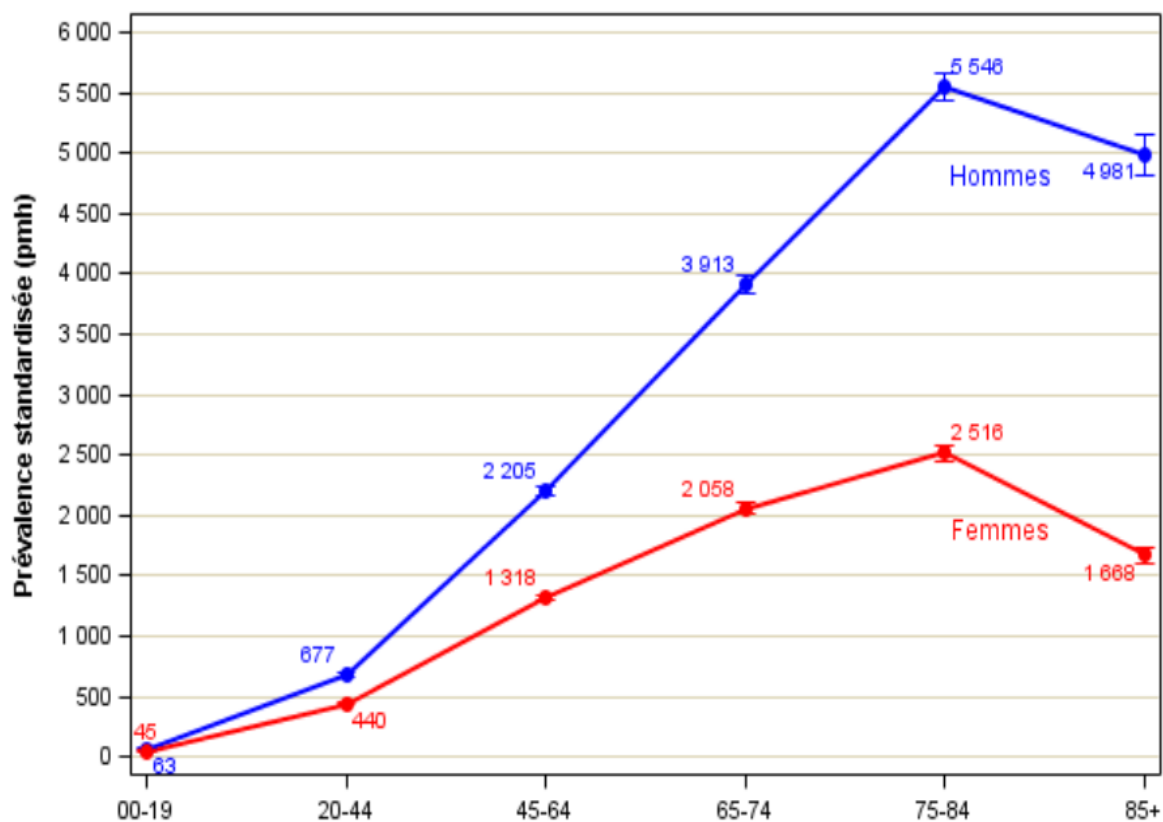


Figure 27: Prévalence de l'IRC au stade terminal selon l'âge et le sexe

En 2015, 1232 cas pmh souffraient d'IRC au stade terminal en France, avec un nombre global de 82295 patients sous traitement de suppléance (Rapport annuel de REIN, 2015).

Aux États-Unis d'Amérique, la prévalence de l'IRC est passée d'environ 10% en 1994 à environ 13% de la population en 2004 et ceci en association avec l'augmentation de la prévalence du diabète, de l'hypertension et des maladies cardiovasculaires, d'où l'importance d'établir des stratégies de santé publique pour la prise en charge de ces malades en tenant compte de l'IRC ¹⁵⁰. Selon la cohorte CKD-PC (Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium) groupant plus de 2 millions de patients atteints d'IRC provenant de 40 pays du monde, la prévalence de l'IRC est estimée entre 10 et 16% des adultes¹⁵¹.

3.1.3. Incidence

L'incidence est le nombre de nouveaux cas d'une maladie, apparus durant une période de temps donnée. Selon le rapport annuel de REIN 2015, l'incidence de l'IRC au stade terminal était de 166 cas pmh en France, avec un âge médian de 70 ans. Dans 45% des cas, cette morbidité était associée avec le diabète, et dans 58% des cas avec les maladies cardiovasculaires. L'incidence était significativement moins élevée chez les femmes à partir de l'âge de 45 ans (Figure 29).

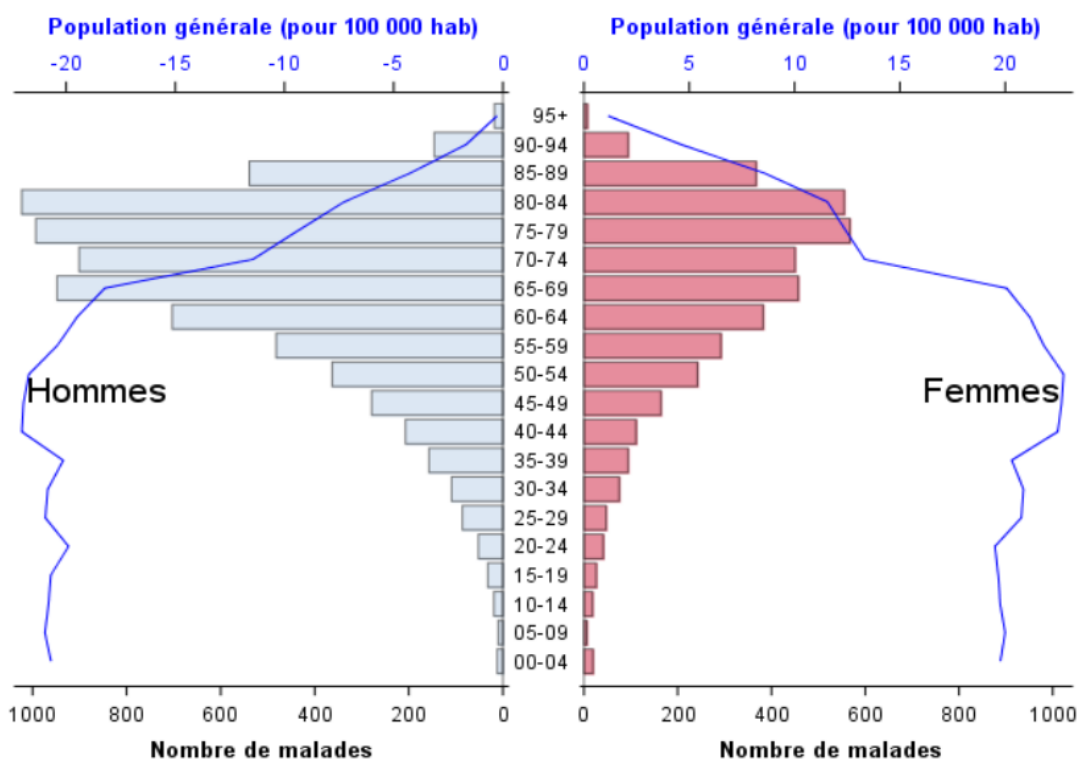


Figure 28: Incidence de l'IRC au stade terminal selon l'âge et le sexe

En France, et à l'année 2015, l'âge médian estimé de l'IRC au stade terminal était de 70 ans pour l'ensemble des deux sexes, avec une incidence moins élevée chez les femmes (Rapport annuel de REIN, 2015).

En Europe, l'incidence de l'IRC au stade terminal a augmenté de 110 pmh en 1997 à 120 pmh en 2000. Depuis l'an 2000, le taux de l'incidence s'est stabilisé et a atteint 125,4 pmh en 2006¹⁵².

3.1.4. Mortalité

Selon le rapport annuel de REIN 2015, la probabilité de survie des patients atteints d'IRC au stade terminal, à partir du début du traitement, était de 83% pour la première année de traitement par dialyse, et chute dramatiquement à 33% après 10 ans de traitement, avec un âge médian de

survie de 5 ans (Figure 30). L'âge au début de la dialyse, le diabète et les maladies cardiovasculaires influencent fortement la survie des patients (Rapport annuel de REIN 2015).

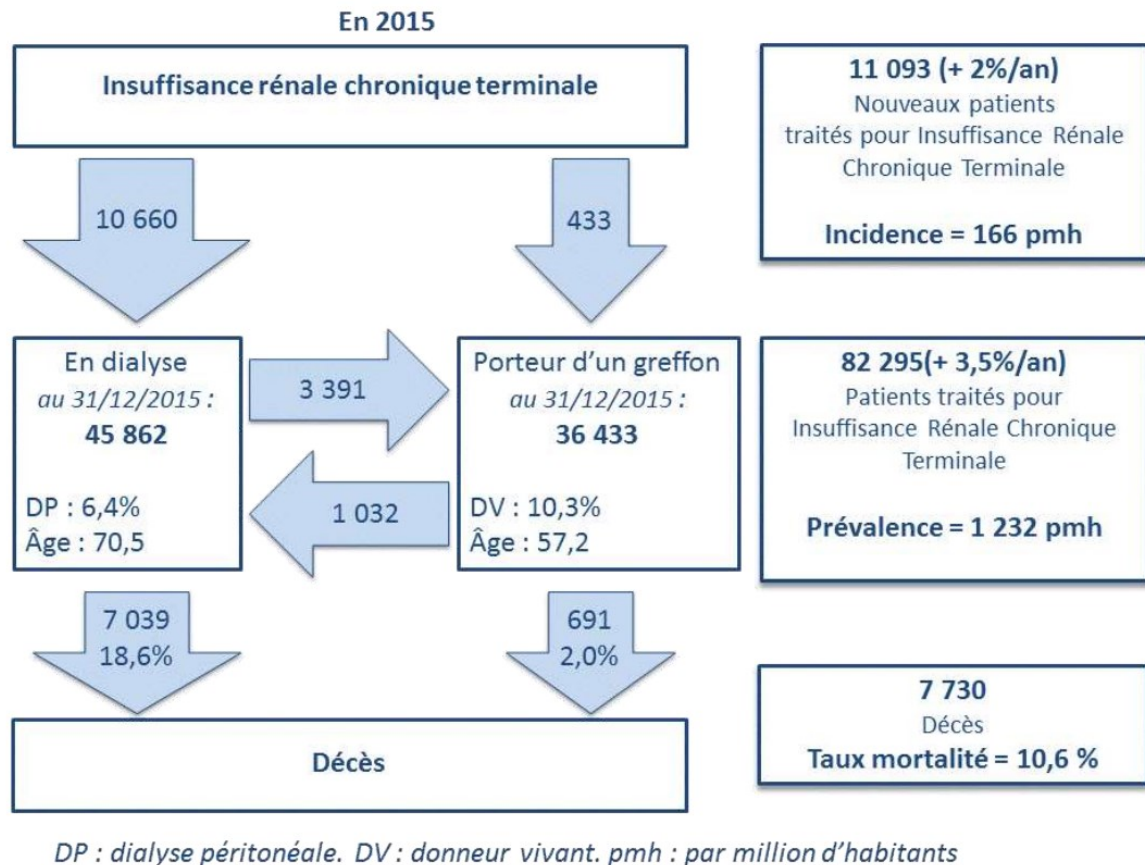


Figure 29: Rapport annuel de REIN en 2015 pour les patients au stade terminal d'IRC

Un suivi fait sur une cohorte de 1120295 patients atteints d'IRC au stade terminal entre les années 1996 et 2000 a démontré une forte corrélation entre un DFG<60mL/min/1,73m² et l'hospitalisation, la mortalité cardiovasculaires et la mortalité toutes causes confondues, ce qui met l'accent sur l'importance de l'étude approfondie de l'IRC¹⁵³.

3.2. Impact de l'IRC sur la CV

La prévalence des CV chez les patients atteints d'IRC a suscité un grand intérêt dernièrement, avec une multitude d'études décrivant l'impact de l'IRC sur la morbidité et la mortalité cardiovasculaire et de toutes causes confondues. Une méta-analyse compilant 5 études avec un total de 1098 participants a rapporté un ratio d'environ 6,20 de survenue d'évènements cardiovasculaires par rapport à l'absence d'IRC (Figure 31)¹⁰.

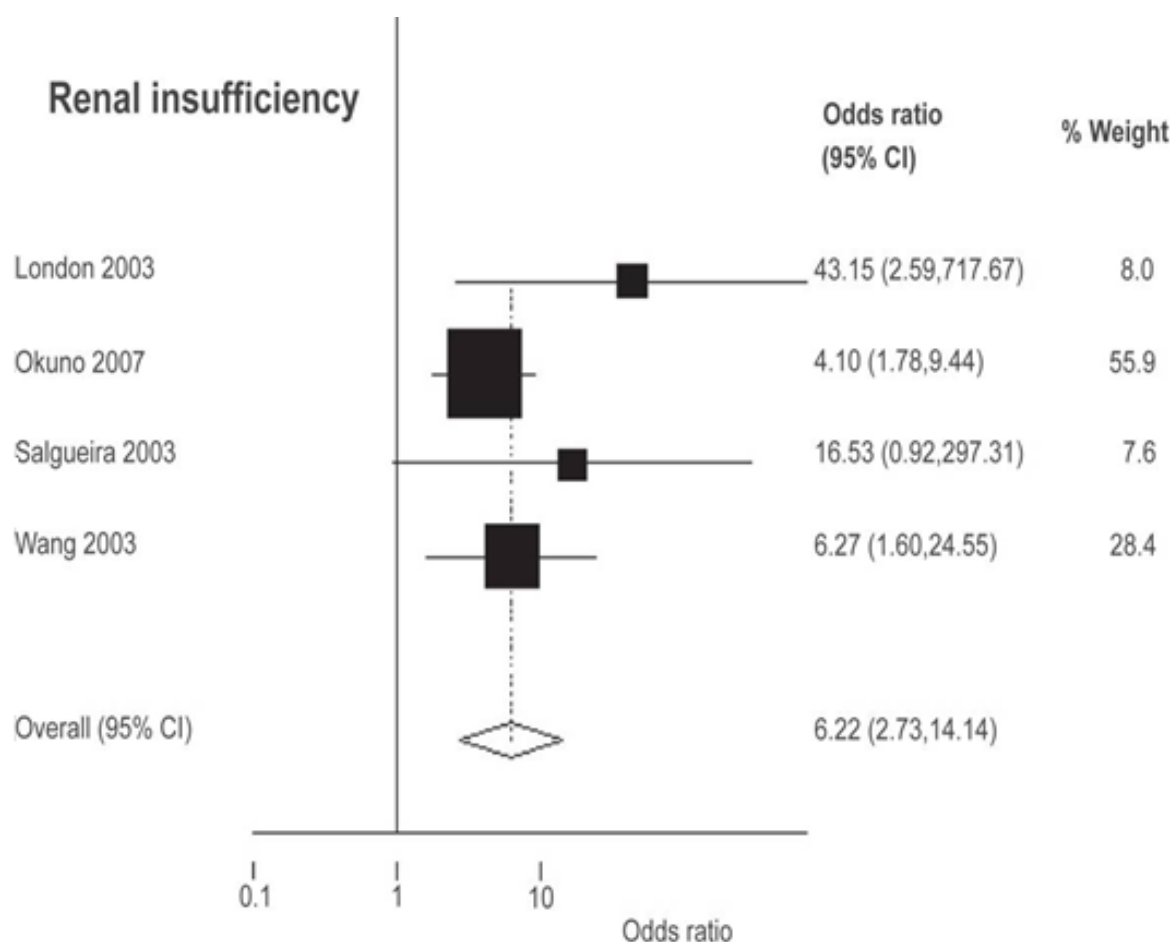


Figure 30: Ratio de maladies cardiovasculaires en présence d'IRC

Dans la méta-analyse compilant 5 études et un total de 1098 participants, 124 évènements cardiaques ont été observés avec un ratio d'environ 6,20. La présence de CV était le plus puissant indice pronostique de la survenue d'un évènement cardiovasculaire chez les patients atteints d'IRC¹⁰.

Une autre méta-analyse réalisée sur une période de 18 ans, entre 1986 et 2004, portant sur 85 publications et comprenant 552258 participants, a confirmé le lien entre l'IRC et la survenue des événements cardiovasculaires, avec la moitié de la mortalité chez les patients atteints d'IRC dues à des évènements cardiovasculaires¹⁵⁴. L'American Heart Association a également indiqué que les personnes atteintes d'IRC sont les plus à risque d'évènements cardiovasculaires¹⁵⁵. Selon l'étude clinique épidémiologique de Foley *et al*, la mortalité par évènement cardiovasculaire est dix à trente fois plus élevée chez les patients atteints d'IRC au stade terminal par rapport à la population générale¹⁵⁶. Une autre étude par Russo *et al* a démontré que la prévalence des calcifications coronaires est de 40 % chez les patients atteints d'IRC versus 13 % de sujets contrôles ayant une fonction rénale normale et un même âge¹⁵⁷, ce qui va dans le même sens que l'étude de Kramer *et al* qui a démontré une corrélation positive entre les calcifications coronaires et l'IRC¹⁵⁸. Les calcifications coronaires se manifestent aussi chez les personnes jeunes atteintes d'IRC¹⁵⁹. De plus, la prévalence des calcifications aortiques est significativement plus élevée chez les patients hémodialysés par rapport aux sujets contrôles ayant même âge, sexe et une fonction rénale normale, avec un taux de 79 % sous hémodialyse contre 37,5 % de la population contrôle¹⁶⁰. En outre, le temps passé en hémodialyse est un facteur de risque important pour le développement des CV intimale et médiale¹⁶¹, avec un taux de survie diminué avec la calcification médiale et d'autant plus avec la calcification intimale (Figure 32)⁸⁵.

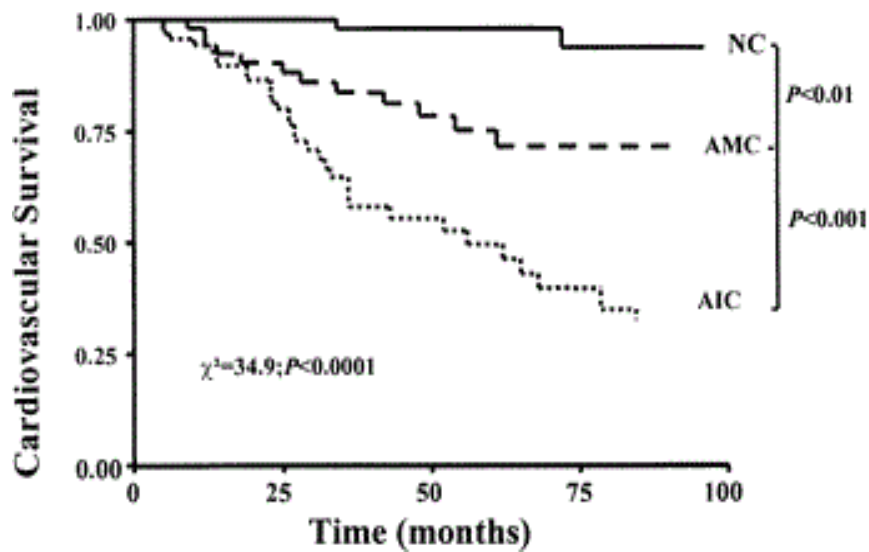


Figure 31: La mortalité par évènement cardiovasculaire des patients atteints d'IRC au stade terminal

Sur 202 patients atteints d'IRC au stade terminal, la survie était nettement inférieure en présence de CV médiale qu'en absence de CV, et cette survie était la plus faible en présence de CV intimale ⁸⁵.

En résumé, les patients atteints d'IRC au stade terminal présentent des CV intimale et médiale fréquentes, avec des taux de mortalité toutes causes confondues et de mortalité par évènement cardiovasculaire beaucoup plus élevés que la population générale, d'où l'importance d'étudier dans l'IRC le rôle des inducteurs des CV tels que l'hyperphosphatémie et les toxines urémiques^{162,163}.

3.3. Rôle du phosphate durant l'IRC

La concentration sérique de Pi chez les patients hémodialysés sans traitement hypophosphatémiant dépasse 2 mM, et est bien supérieure à la normale (1 à 1,5 mM)¹⁶⁴. L'hyperphosphatémie est directement associée à l'augmentation du risque cardiovasculaire chez les patients atteints d'IRC¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Un régime alimentaire riche en phosphore a intensifié la

CV et induit un phénotype ostéogénique des CMLV dans les vaisseaux calcifiés des rats IRC¹⁶⁸. Le régime alimentaire riche en phosphore a également augmenté les CV médiales chez les souris IRC, par rapport à un apport normal en phosphate¹⁶⁹. Des concentrations élevées en Pi ont aussi induit des CV médiales sur des segments aortiques de rats exposés *ex vivo*¹⁷⁰. De nombreuses études *in vitro* sur des CMLV ont établi le rôle du Pi dans la transdifférenciation ostéogénique, et ceci par l'induction de l'expression des gènes impliqués dans l'ostéogenèse, notamment la RUNX2, BMP2 et ALP, et par l'inhibition de l'expression des gènes contractiles des CMLV tels que la SMMHC (smooth muscle myosin heavy chain), l' α -SMA (alpha smooth muscle cell actin) et la SM22 α (smooth muscle protein 22 alpha) (figure 33)^{23,171-173}. En outre, le Pi a induit la sécrétion des vésicules matricielles et l'apoptose des CMLV¹⁷³.

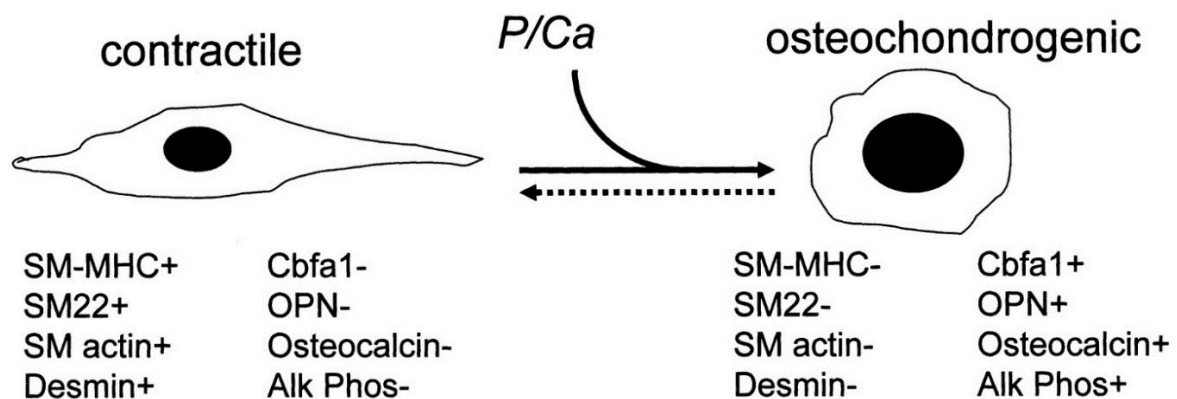


Figure 32: Transdifférenciation ostéogénique des CMLV sous l'effet de Pi

Sous l'effet de Pi, les CMLV perdent leurs marqueurs contractiles comme la SMMHC, la SM22 α et l' α -SMA, et commence à exprimer les marqueurs ostéogéniques comme RUNX2, ALP et OPN, signalant leur transdifférenciation ostéogénique¹⁷².

Le transport du phosphate par Pit-1, qui appartient au type III des co-transporteurs de phosphate dépendant du sodium, est essentiel pour la calcification des CMLV *in vitro* et pour la transdifférenciation ostéogénique (Figure 34)¹⁷⁴.

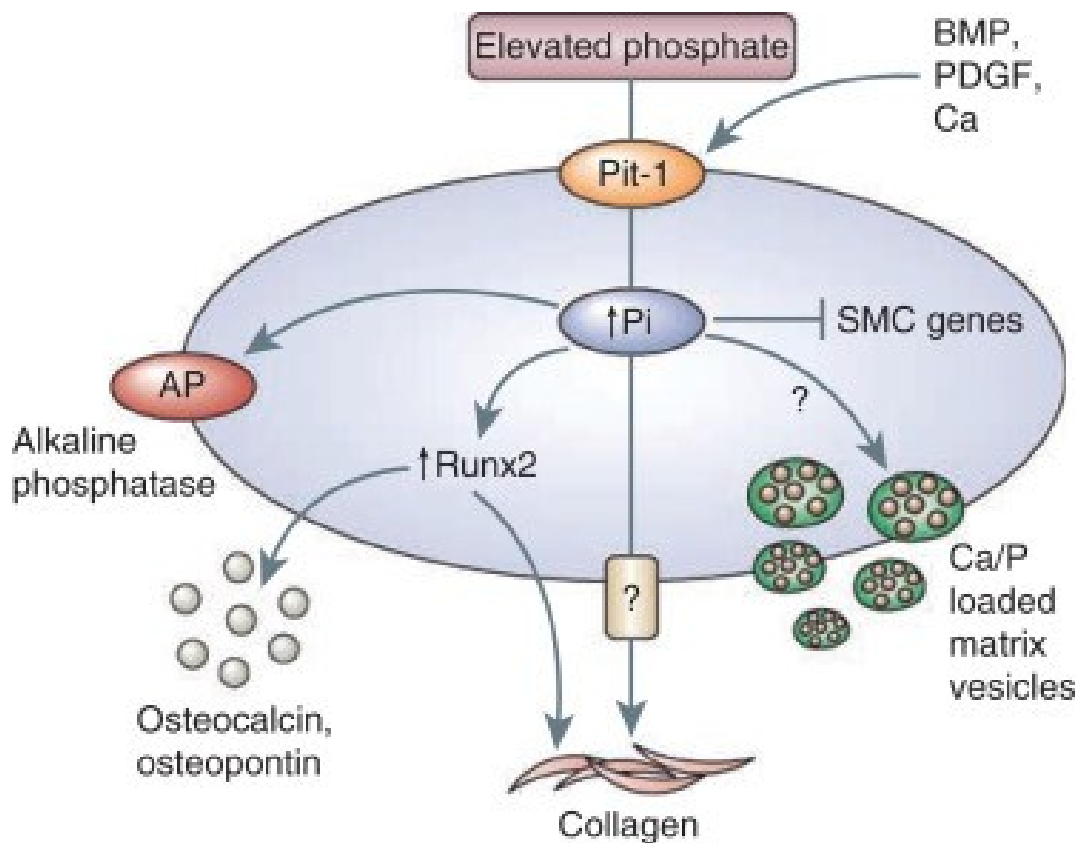


Figure 33: Mécanismes d'action du Pi sous le contrôle de Pit-1

Pit-1 transporte le Pi à l'intérieur des CMLV. Une fois pris en charge, le Pi induit l'expression de *RUNX2*, et par la suite celle de l'OPN et du collagène du type 1, tout en inhibant celle des gènes contractiles. Le Pi entraîne aussi l'expression de ALP et favoriserait la libération de vésicules matricielles riche en hydroxyapatite¹⁷⁴.

En effet, le blocage de Pit-1 empêche la calcification des CMLV *in vitro*²³, et prévient l'induction de l'expression de *RUNX2* par le Pi même à fortes concentrations^{119,171}.

Cependant, l'hyperphosphatémie seule n'explique pas la prévalence de la CV chez les patients atteints d'IRC. En effet, le sérum de ces patients entraîne la calcification des CMLV et l'expression de l'OPN, l'ALP et *RUNX2*, et ceci d'une façon indépendante de la concentration en phosphate^{108,144}. D'où la nécessité d'investiguer les effets des toxines urémiques, notamment l'indoxyle sulfate (IS), sur les CV.

3.4. Rôle des toxines urémiques

L'IRC est marquée par une détérioration structurelle et fonctionnelle des reins qui n'assurent plus leur rôle de filtration. Ainsi, les déchets métaboliques ne sont plus éliminés et s'accumulent dans le sang ; ses déchets prennent le nom de toxines urémiques. Ces toxines sont typiquement classées en trois catégories selon leur propriétés physico-chimiques déterminant leur comportement durant la dialyse: les petites molécules hydrophiles de taille inférieure à 500 Da, les composés de taille intermédiaire supérieure à 500 Da, et les molécules liées aux protéines^{175,176}.

3.4.1. Généralités

Les mécanismes impliqués dans l'augmentation du risque cardiovasculaire des patients atteints d'IRC ne sont pas encore complètement élucidés; mais les facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels, comme le diabète et l'hypertension artérielle, ne peuvent expliquer seuls ce surrisque¹⁵⁵. En revanche, l'accumulation des toxines urémiques au cours de l'IRC pourrait en être responsable. Parmi ces toxines, l'IS fait l'objet de beaucoup de recherche compte tenu de ses effets délétères dans le système cardiovasculaire. L'IS est principalement lié à l'albumine¹⁷⁷, ce qui rend difficile son élimination par l'hémodialyse¹⁷⁸. L'IS s'accumule donc dans le sang des patients atteints d'IRC avec des concentrations supérieures à 200 μ M chez les patients hémodialysés contre des concentrations inférieures à 2 μ M chez les individus sains¹⁷⁹. Barreto et al sont les premiers à établir le lien entre la concentration sérique en IS et le stade de l'IRC (Figure 35)¹⁸⁰.

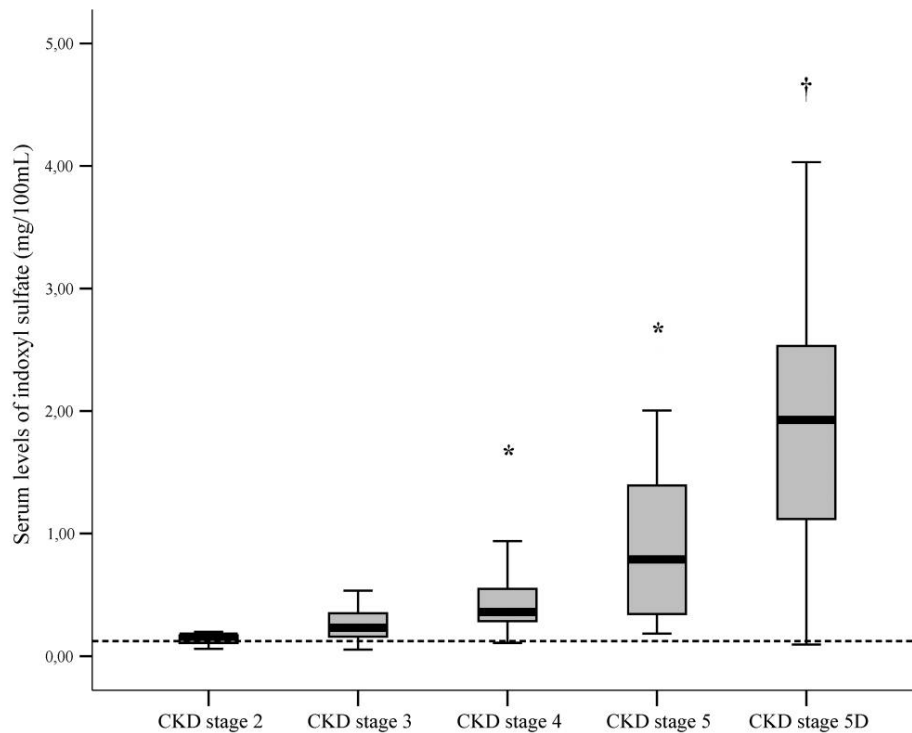


Figure 34: La concentration sérique d'IS chez les patients atteints d'IRC

Sur une étude faite sur 139 patients, la concentration sérique d'IS accroissait de façon progressive avec la sévérité de l'IRC et ceci dès les premiers stades de la maladie, avec une augmentation dramatique chez les patients hémodialysés, compte tenu de la difficulté d'éliminer l'IS par l'hémodialyse conventionnelle¹⁸⁰.

L'IS entraîne une hypertrophie cardiaque et induit un stress oxydatif, d'une manière concentration-dépendante, alors que d'autres toxines urémiques liées aux protéines n'ont que peu ou pas d'effet; d'où l'intérêt que nous allons porter sur l'IS, et son rôle dans la CV lors de l'IRC, dans la suite du manuscrit.

3.4.2. Formation de l'IS

Le tryptophane alimentaire est le précurseur de l'IS. Au niveau du colon, le tryptophane est métabolisé en indole par plus de 85 bactéries de la flore intestinale. L'indole subit au niveau hépatique une oxydation et l'ajout d'un groupement sulfate, pour former l'IS. L'IS s'accumule dans le sang des patients atteints d'IRC et engendre des toxicités vasculaires (Figure 36)¹⁸¹⁻¹⁸³.

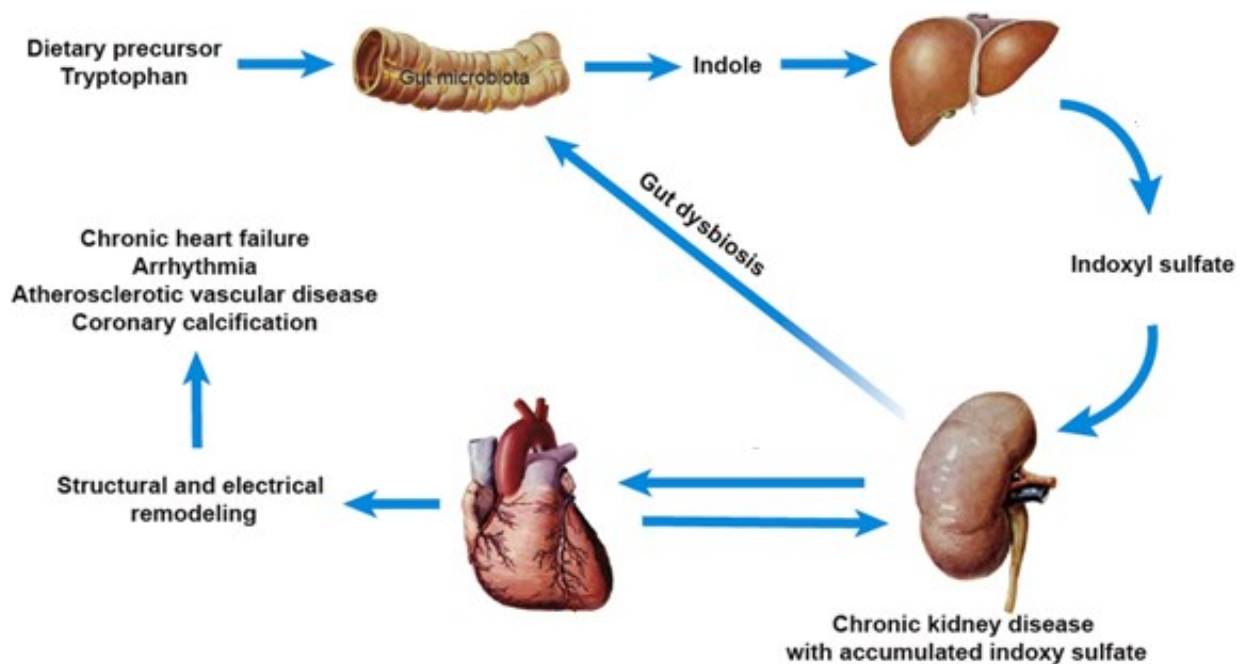


Figure 35: Représentation schématique de l'origine de l'IS

L'IS a pour précurseur alimentaire le tryptophane. Ce dernier est converti en indole par les bactéries de l'intestin; et au niveau du foie, l'indole est transformé en IS suite à une série de réaction d'oxydation et d'ajout de groupe de sulfate. Durant l'IRC, l'IS s'accumule dans le sang et engendre des maladies au niveau du système intestinale, rénale, cardiaque et cardiovasculaire (Figure adaptée de Gao et al)¹⁸¹.

La détermination de la concentration sérique d'IS chez les patients atteints d'IRC et sous hémodialyse a montré que les patients sans colon ont des concentrations plus faibles d'IS que ceux avec un colon¹⁸⁴, ce qui corrobore le rôle des bactéries de la flore intestinale dans le métabolisme de l'IS.

3.4.3. Études cliniques sur le lien entre l'IS et les maladies cardiovasculaires

Plusieurs études cliniques ont établi le lien entre le stade de l'IRC et la concentration sérique d'IS. Itoh *et al* ont trouvé des concentrations sériques d'IS 54 fois plus élevées chez les patients dialysés par rapport à la population saine, ce qui s'explique d'une part que l'IS est liée à l'albumine et échappe, jusqu'à 70%, à l'hémodialyse¹⁸⁵. Une autre étude clinique comprenant 139 patients souffrant d'IRC a démontré qu'une concentration sérique d'IS plus élevée est associée à un risque de mortalité par événement cardiovasculaire plus prononcé (Figure 37)¹⁸⁰.

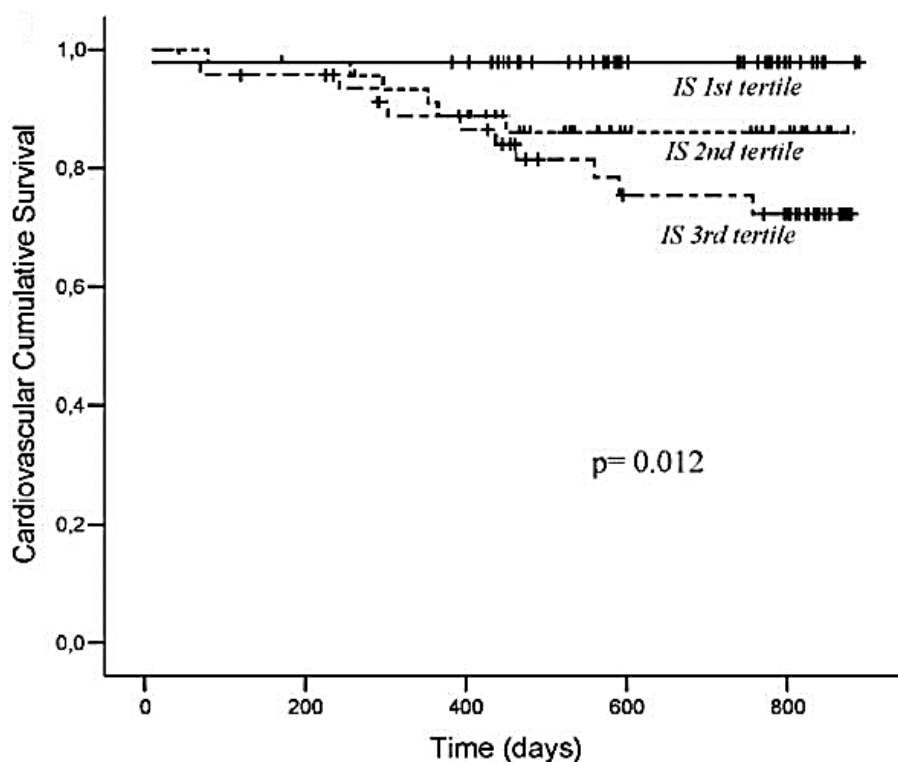


Figure 36: La mortalité cardiovasculaire en fonction de la concentration sérique en IS

139 patients atteints d'IRC ont été classés en trois groupes selon leur concentration sérique d'IS. Les patients des deux tertiles supérieurs d'IS ont eu une mortalité par évènement cardiovasculaire plus élevée que le premier tertile, établissant ainsi la concentration sérique d'IS comme un marqueur pronostic de mortalité par évènement cardiovasculaire¹⁸⁰.

Selon Barreto *et al*, l'IS n'est pas seulement associée à une augmentation de la mortalité par évènement cardiovasculaire, mais aussi à une augmentation de la mortalité toutes causes confondues (Figure 38)¹⁸⁰.

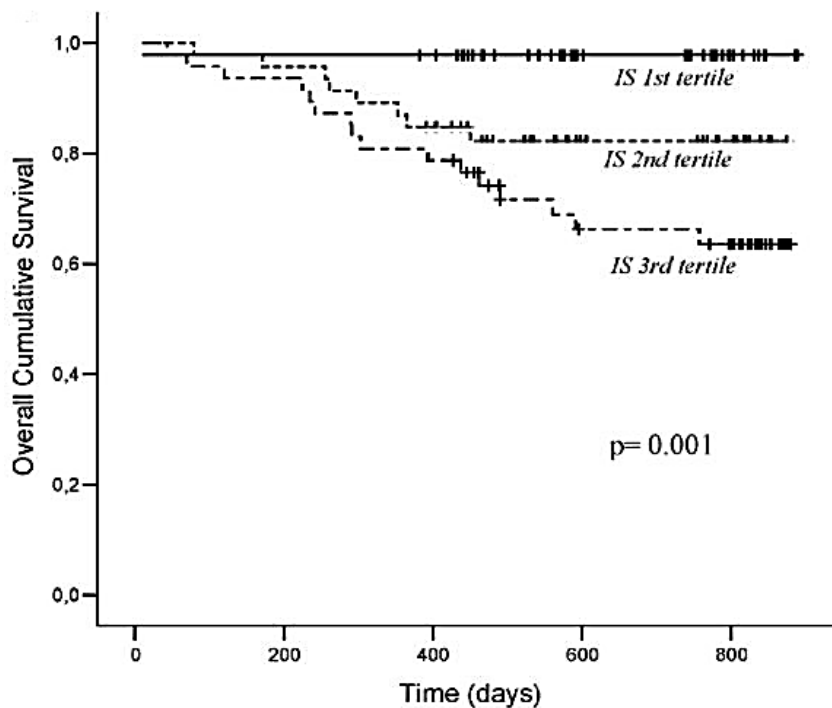


Figure 37: La mortalité toutes causes confondues en fonction de la concentration sérique en IS

Selon Barreto *et al*, la concentration sérique d'IS peut servir comme marqueur pronostic de la mortalité toutes causes confondues chez les patients atteints d'IRC, évidente par la chute dramatique de survie des patients appartenant au tertile supérieur d'IS, dans les 800 premiers jours de suivi¹⁸⁰.

Cependant, une autre étude sur 70 patients souffrants d'IRC mais non dialysés n'a pas établi de lien entre la mortalité toutes causes confondues et la concentration sérique d'IS, mais plutôt un lien avec un risque plus élevé d'événement cardiovasculaire¹⁸⁶. Ces observations suggèrent néanmoins fortement que ces toxines urémiques ont un rôle causal dans les maladies cardiovasculaires.

3.4.4. Stratégies de réduction de l'IS

Les méthodes de dialyse conventionnelles n'arrivent pas à éliminer l'IS du fait de sa forte liaison à l'albumine; et même l'augmentation de la fréquence de la dialyse, jusqu'à 6 fois par semaine, n'aboutit pas à réduire d'une manière significative les taux de l'IS comme ça a été démontré dans « Frequent Hemodialysis Network Daily Trial », une étude clinique à long terme conduite entre 2006 et 2010 dans 11 centres d'hémodialyse universitaires et 54 centres communautaires en Amérique du Nord (Figure 38)¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Compte tenu des effets néfastes de l'IS sur le système cardiovasculaire, des stratégies de réduction du taux de cette toxine urémiques sont en cours d'élaboration.

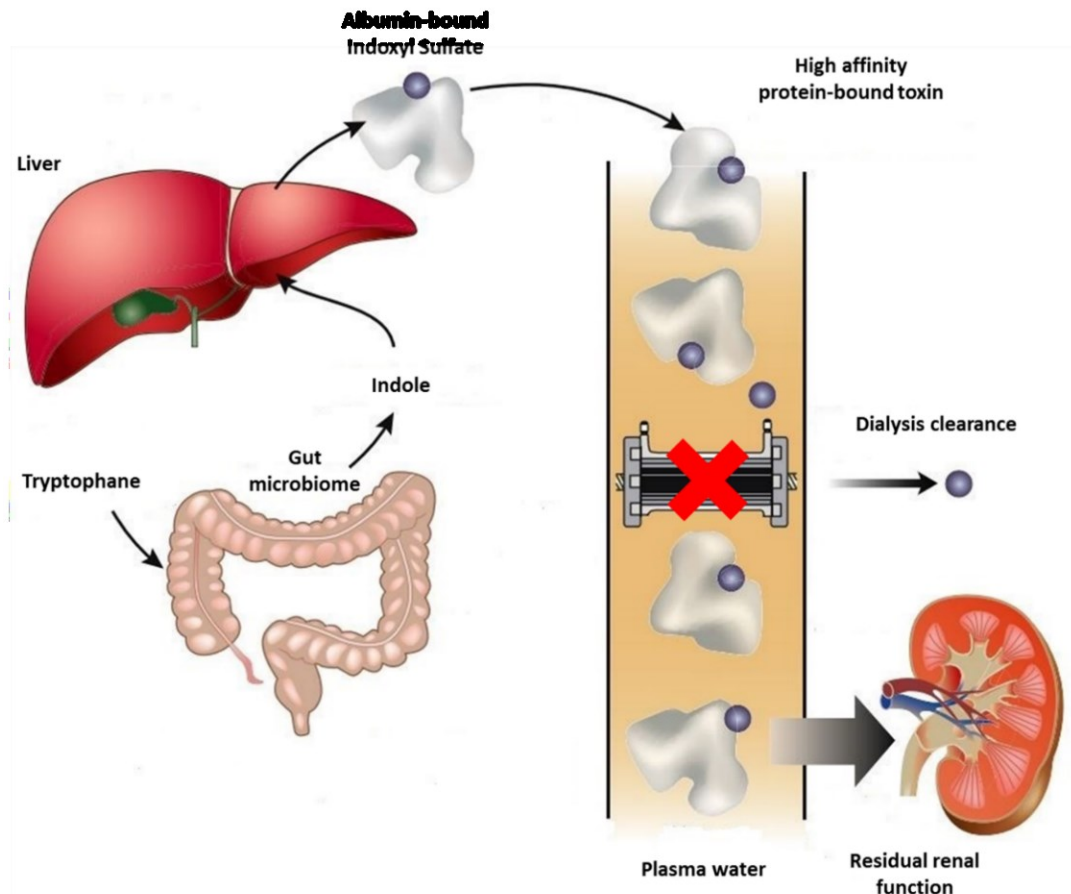


Figure 38: Les propriétés physicochimiques de l'IS rendent la dialyse conventionnelle inefficace

La liaison à haute affinité de l'IS à l'albumine rend difficile son élimination par l'hémodialyse conventionnelle, qui tend à favoriser l'élimination des toxines urémiques hydrosolubles non liées aux protéines plasmatiques (Figure adaptée de Davenport et al)¹⁸⁷.

a) Au niveau du sang

Le ratio de diffusion de l'IS constitue une limitation aux méthodes de dialyses conventionnelles du fait de sa liaison à l'albumine. Deux études faites par Luo *et al* et Meyer *et al* ont démontré que l'augmentation du coefficient de surface de la dialyse et du débit du dialysat améliore l'efficacité de la dialyse traditionnelle dans l'élimination des toxines urémiques liées aux protéines. Cependant, les modèles utilisés nécessitent de très fortes augmentations à la fois du coefficient de surface de la dialyse et du débit du dialysat pour approcher le débit sanguin de

200 mL/min^{190,191}. En outre, comme cela a aussi été confirmé *in vitro*, l'ajout de charbon actif au dialysat permettrait d'augmenter la clairance des toxines urémiques liées aux protéines sans modifier fortement la clairance des solutés non liés¹⁹².

b) Au niveau des métabolites de l'IS

➤ Réduction des sources alimentaires du tryptophane

Sachant que le précurseur de l'IS est le tryptophane, un régime alimentaire faible en protéine pourrait être une solution efficace au défi de réduction de l'IS. Niwa *et al* ont démontré que ce type de régime est associé à une baisse des concentrations urémiques et sériques d'IS chez des rats urémiques 5/6-néphrectomisés et chez 22 patients atteints d'IRC au stade pré-dialyse¹⁹³. Néanmoins, l'effet néfaste à long terme de ce régime alimentaire n'est pas négligeable ; le suivi d'une étude clinique qui a eu lieu originairement entre 1989 et 1993 et qui a inclu 255 patients atteints d'IRC dont la majorité au stade 4 et non diabétiques a montré que ce régime aggrave la mortalité et est inefficace dans le freinage de la progression de la maladie rénale (Figure 39)¹⁹⁴.

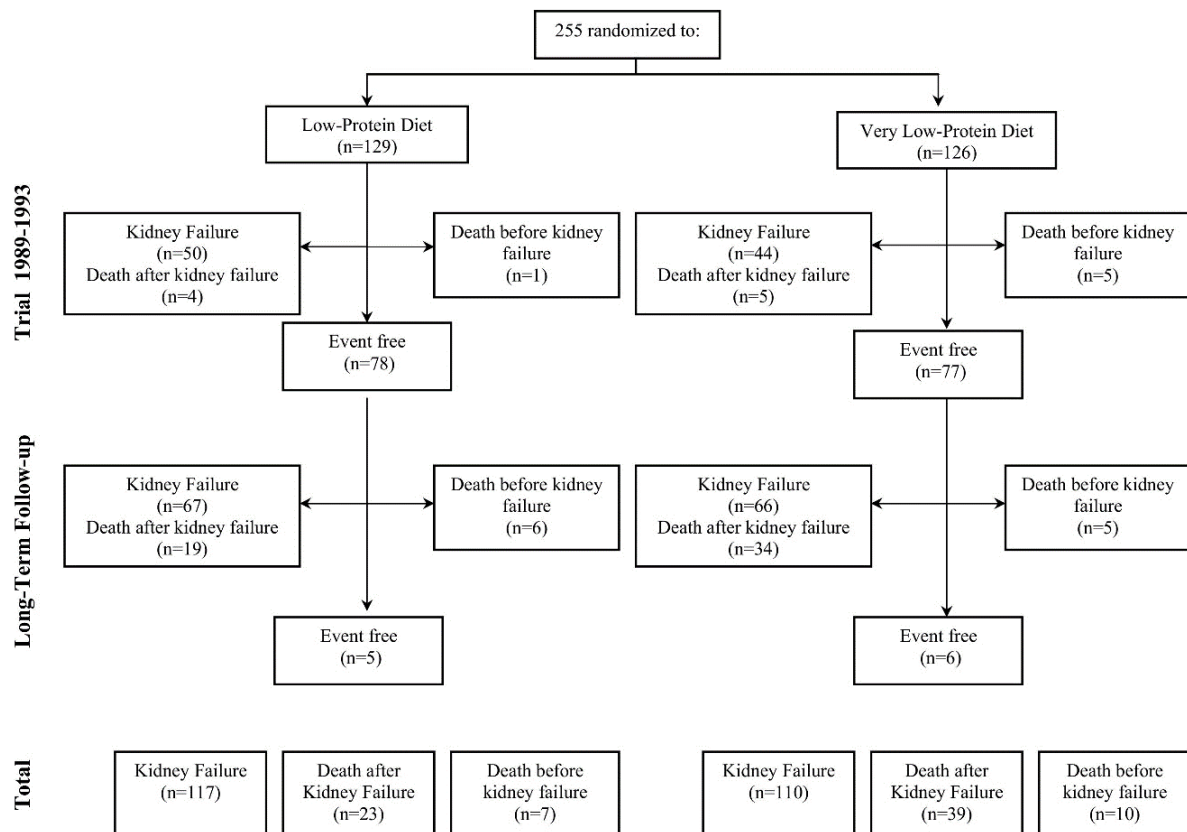


Figure 39: Rapport de l'étude clinique sur le régime pauvre en protéines et de son suivi à long terme

Le rapport du suivi à long terme de l'étude clinique a montré un taux plus élevé de décès consécutifs à la progression de la maladie rénale chronique chez le groupe sur le régime alimentaire le plus pauvre en protéines¹⁹⁴.

➤ Empêchement de la digestion bactérienne du tryptophane

Les concentrations sérique, urinaire et fécale d'IS peuvent être diminuées par l'administration des pré ou des probiotiques, mais les effets de la perturbation de la flore intestinale sur l'IRC et les maladies cardiovasculaires n'a pas été étudié à long terme¹⁹⁵.

➤ **Prévention contre l'absorption de l'indole à l'aide des adsorbants oraux**

Une autre stratégie de réduction de l'IS sérique est d'empêcher son absorption intestinale grâce à l'administration orale d'un adsorbant à base de charbon actif, l'AST-120 (Figure 40)¹⁹⁶.

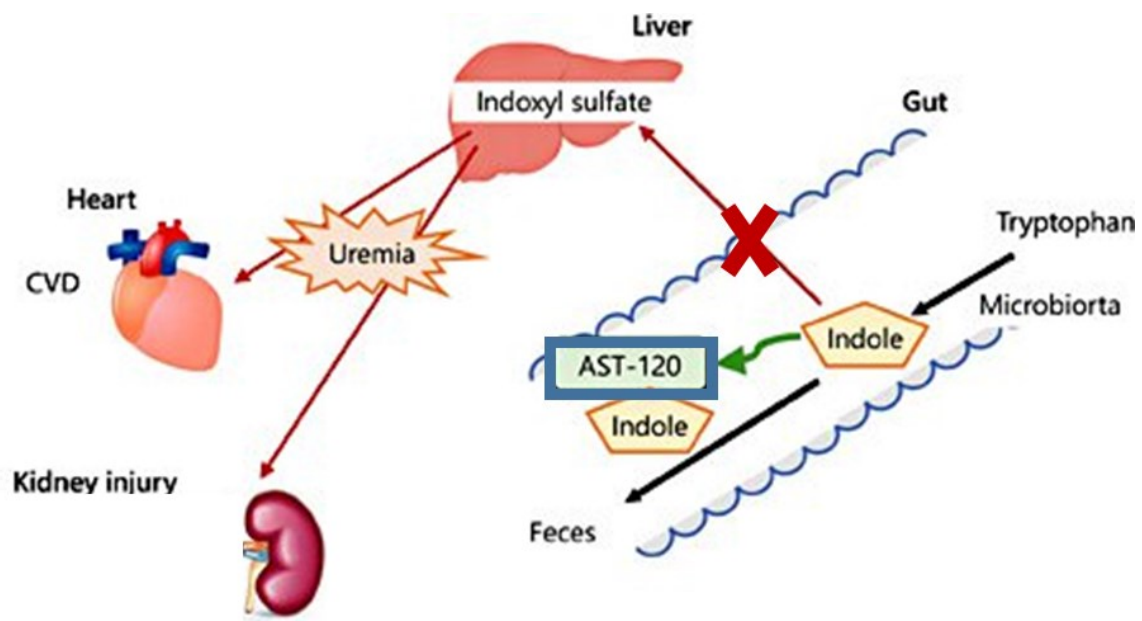


Figure 40: Représentation schématique du mode d'action de l'AST-120

L'AST-120 adsorbe l'indole au niveau du colon et empêche ainsi son absorption intestinale et sa conversion ultérieure en IS par le foie, protégeant ainsi contre les actions de l'IS sur les systèmes cardiovasculaire et rénales¹⁹⁶.

Sur une étude clinique comprenant 120 patients atteints d'IRC au stage 3, l'AST-120 a diminué le niveaux de métabolites réactifs de l'oxygène mesuré après 3 et 6 mois de traitement¹⁹⁷, ce qui a été associé à la prévention contre la fibrose cardiaque et les lésions rénales chez deux modèles de rats, l'un à hypertension spontanée et l'autre à rein droit enlevé^{198,199}. Chez des rats urémiques 5/6-néphrectomisés, la réduction de la concentration sérique d'IS par l'administration de l'AST-120 a protégé contre la fibrose cardiaque²⁰⁰. Toutefois, des essais

cliniques randomisés sont essentiels pour apporter des preuves irréfutables sur les effets thérapeutiques de l'AST-120.

En résumé, bien que plusieurs stratégies de réduction de la concentration sérique d'IS aient été explorées, elles s'avèrent actuellement décevantes et non utilisées en routine dans la prévention des effets toxiques de l'accumulation d'IS chez les patients atteints d'IRC.

3.4.5. Rôle de l'IS dans les CV

a) Effets sur les CE

Le dysfonctionnement endothélial est une étape clé dans la pathogenèse de la calcification athérosclérotique^{201,202}. Les patients atteints d'IRC sont plus à risque de développer une CV athérosclérotique et un dysfonctionnement endothélial²⁰³.

L'une des toxines urémiques impliquée dans ce phénomène est l'IS. La toxicité vasculaire de l'IS sur les CE du cordon ombilical humain (HUVEC) a été étudiée *in vitro* par Dou *et al* qui ont montré que l'IS inhibe la prolifération des HUVEC et la réparation des lésions endothéliales, même en présence de 4 % d'albumine¹⁶. Dans une étude ultérieure, Dou *et al* ont attribué cet effet à l'induction de la production des ERO et de l'enzyme pro-oxydative NADPH-oxydase¹⁷.

L'administration de l'adsorbant AST-120 de l'indole, le précurseur métabolique de l'IS, a entraîné l'augmentation de la production du NO ainsi que la forme réduite du glutathion chez 40 patients atteints d'IRC après 6 mois de traitements, suggérant ainsi que l'IS pourrait engendrer un stress oxydatif²⁰⁴. Tumor *et al* ont constaté que l'IS induit la production de la NADPH-oxydase 4 par les HUVEC, et inhibe celle du NO, tout en diminuant la viabilité cellulaire¹⁸. De plus, l'IS joue un rôle dans l'athérosclérose en entraînant l'expression de

molécules d'adhésion dans les CE, notamment celles de la monocyte-chemoattractant protéine-1^{21,205}, la molécule d'adhésion-1 à travers l'activation du facteur nucléaire kappa-B (NF- κ B)¹⁸, et la molécule d'adhésion des CE aux leucocytes E-selectine^{19,20}. En outre, le traitement des HUVEC avec l'IS entraîne leur senescence via activation de la voie de signalisation de la p53 par les ERO (Figure 41)^{195,206}.

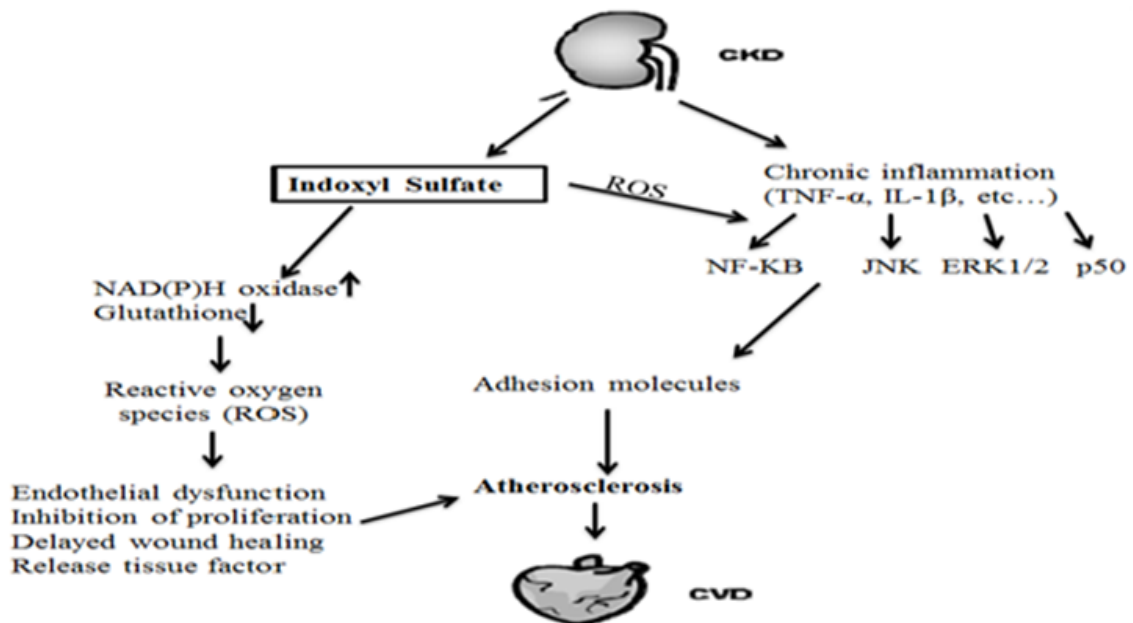


Figure 41: L'effet de l'IS sur le dysfonctionnement endothélial

Dans le cadre de l'IRC, l'IS entraîne un stress oxydatif qui active l'expression des molécules d'adhésion à travers les voies de signalisation des cytokines d'inflammation NF- κ B et JNK. En parallèle, l'IS entraîne le dysfonctionnement endothélial ainsi que la libération du facteur tissulaire, tout en inhibant la prolifération et la cicatrisation, et ceci à travers l'induction de la NADPH oxydase et la diminution du glutathione. Tous ces effets peuvent culminer en une athérosclérose menant à des complications cardiovasculaires¹⁹⁵.

Schroeder *et al* ont démontré que l'IS est un ligand du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR). Ce facteur de transcription est impliqué notamment dans le métabolisme des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) comme le benzopyrène, les biphényles chlorés

plans (PCBs) et les hydrocarbures aromatiques halogénés comme les dioxines. Il est également impliqué dans l'immunité à médiation cellulaire. L'activation prolongée d'Ahr par l'IS est responsable d'un métabolisme médicamenteux altéré et d'une toxicité élevée chez les patients atteints d'IRC²⁰⁷. L'activation de l'Ahr par l'IS induit la sénescence des HUVECs²⁰⁸, les interactions des CE-leucocytes par stimulation de l' « activator protein-1 »²⁰⁹, l'expression de l'IL-6 par les CE via la voie de la NF- κ B²¹⁰ et la production du facteur tissulaire par les CE²¹¹.

b) sur les CML

La CV résulte en partie de la transdifférenciation ostéogénique des CMLV, et le milieu urémique accélère cette calcification^{13,212,213}. Muteliefu *et al* ont montré *in vitro* que les CMLV humaines exposées à l'IS expriment des marqueurs ostéogéniques, tels que le RUNX2, l'ALP et l'OPN, et sont soumises à un stress oxydatif¹⁴. Dans une étude ultérieure, Muteliefu *et al* ont montré que l'IS engendre la sénescence des CMLV humaines en stimulant l'expression de p53 par les ERO, l'activité de la β -galactosidase, ainsi que l'expression de la Prélamine A, qui sont trois marqueurs de la sénescence cellulaire. L'administration de l'AST-120 à un modèle de rats urémiques a protégé les CMLV aortiques contre la sénescence cellulaire induite par l'IS, et ceci a été démontré par immunohistochimie²¹⁴. En outre, dans un modèle de rats hypertendus traités par de l'IS, l'immunohistochimie a révélé que OPN, RUNX2, ALP étaient co-localisés dans les cellules des zones calcifiées de l'aorte, et ceci était accompagné d'un épaissement de la paroi des aortes arquées, thoraciques et abdominales²¹⁵.

Récemment, des nouvelles études ont démontré le rôle de l'IS dans les calcifications des CMLV²¹⁶⁻²¹⁸. En effet, Wu *et al* ont montré *in vitro* que les CML des veines ombilicales humaines calcifiaient en cas d'exposition à des concentrations élevées d'IS, stimulant l'expression de Pit-1 via l'activation de la voie « c-Jun N-terminal kinase » (JNK). Ceci a été

vérifié par l'utilisation d'un inhibiteur compétitif de Pit-1 qui a atténué considérablement la calcification et la transdifférenciation ostéoblastique des CMLV exposée à 500 μ M d'IS, et similairement par l'inhibition de la voie de signalisation JNK²¹⁷. En parallèle, Zhang *et al* ont confirmé le rôle de l'IS dans la calcification des CMLV en utilisant des CML humaines aortiques. Dans leur étude, ils ont pu démontrer que l'IS inhibe le microARN-29b, qui est un régulateur épigénétique de la CV qui cible les facteurs promoteurs de la différenciation ostéogénique, engendrant l'induction de la voie de la Wnt/ β -caténine connue pour son impact sur la formation osseuse^{218,219}. De même, Zhang *et al* ont observé que cette activation de la signalisation Wnt/ β -caténine été concomitante dans les artères radiales calcifiées des patients atteints d'IRC au stade terminal²¹⁸. Chen *et al* ont également montré que l'IS induit la calcification des CMLVH aortiques *in vitro* en favorisant l'hyperméthylation du gène de Klotho réprimant son expression²¹⁶. La déficience en Klotho dans les artères radiales des patients atteints d'IRC au stade terminale a été déjà constatée, et le taux d'expression de Klotho été associé avec la sévérité de la lésion rénale^{216,220}. L'IS a induit une augmentation de l'expression de l'ADN méthyltransférase dans les CMLVH aortiques *in vitro* et l'inhibition ciblée de cette enzyme par la 5aza-2'désoxycytidine a rétablit le niveau d'expression de Klotho par déméthylation de l'ADN²¹⁶. Ces observations ont été ensuite confirmées *in vivo* chez un modèle de rats urémiques néphrécotomisés au 5/6^e. En effet, l'administration de l'IS a entraîné des CV suite à l'hyperméthylation de Klotho au niveau de l'ADN qui a réprimé son expression dans la média de l'aorte. Ces effets de l'IS ont pu être prévenus par l'administration de 5aza-2'désoxycytidine²¹⁶.

En résumé, les dysfonctionnements du dialogue CE-CMLV semblent importants dans le développement des maladies cardiovasculaires. Celles-ci sont aggravées au cours de l'IRC, problemenat du fait d'une augmentation imporante des CV. Associée à l'hyperphosphémie,

l'IS est l'une des principales toxines urémiques qui s'accumulent dans le sang et les tissus des patients atteints d'IRC. L'IS, mesurée à des concentrations sériques élevées lors de l'IRC terminale, agit à la fois sur les CE et les CMLV et semble aggraver les CV. Cependant, sa contribution dans les dysfonctionnements du dialogue CE-CMLV au cours des CV n'est pas établie

Objectif du travail

Au cours de l'IRC, les niveaux élevés d'IS et de Pi entraînent un dysfonctionnement des CE, une transdifférenciation ostéogénique des CMLV et favorisent le développement des CV. Du fait de l'importance de la communication CE-CMLV dans la formation et la fonction des vaisseaux sanguins et son implication dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, nous avons émis l'hypothèse que les CE exposées à des toxines urémiques sécrètent des facteurs favorisant la calcification des CMLV.

L'objectif initial du travail présenté ici a consisté à induire la calcification des CML aortiques humaines en culture en comparant l'effet de Pi, IS et de l'association PI+IS et de vérifier si le milieu conditionné des CE exposées préalablement aux mêmes toxines urémiques pouvait amplifier ces calcifications. De plus, afin de mettre en évidence sans a priori un facteur endothélial pouvant interagir avec le processus de calcification des CML, nous avons mesuré dans le milieu conditionné des CE exposées à Pi et IS la concentration de 40 facteurs solubles connus pour être impliqués dans la régulation du métabolisme osseux.

Les résultats obtenus dans cette première partie ont montré que le milieu conditionné des CE exposées à Pi et IS amplifiait significativement la calcification des CML. De plus, le milieu conditionné des CE a présenté une augmentation importante de la concentration d'IL-8 sous l'effet de Pi et IS. La suite du travail a donc eu comme objectif d'étudier le rôle de l'IL-8 sur la calcification des CML aortiques et à vérifier si le blocage de l'IL-8 permettrait de prévenir la calcification des CML.

Enfin, l'objectif final a été de vérifier à l'échelle tissulaire grâce à un modèle d'anneau aortique de rat en culture l'impact de Pi et IS sur la calcification vasculaire et sur l'induction de l'IL-8. L'intérêt du blocage de l'IL-8 a également été vérifié dans ce modèle.

Matériel et Méthodes

Modèle Cellulaire:

a) CMLV humaines

Les CMLV humaines ont été isolées à partir d'aortes ascendantes proximales humaines, obtenues après pontage aortique de patients atteints de diverses maladies cardiovasculaires (Pr. Caus, Pôle Cœur Thorax Vaisseaux, CHU Amiens, France). Les patients ont donné un consentement éclairé écrit conformément à la législation française, sous le protocole N82009-19, CPP Nord-Ouest II. Brièvement, après la collecte d'aortes ascendantes proximales humaines, les segments aortiques ont été stockés dans du milieu «Dulbecco's Modified Eagle's Medium» (DMEM) complété avec 1% de pénicilline/streptomycine (P/S) et 1% de glutamax (Glx). Le DMEM et le P/S ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Etats-Unis) alors que le Glx a été obtenu auprès d'Invitrogen (Saint Aubin, France). Le tissu médial a été séparé de l'endothélium et de l'adventice par nettoyage avec des pinces stériles sous une hotte à flux laminaire et coupé en segments d'approximativement 2 mm² à l'aide d'un scalpel stérile. Les explants d'aorte proximale humaine ont ensuite été placés dans des boîtes de Pétri coatées à la gélatine (0,2% de gélatine dans du PBS, Sigma-Aldrich) et cultivés dans du DMEM complet supplémenté par 15% de sérum bovin fœtal (SVF, Dominique Dutcher Laboratories, Brumath, France). Les boîtes de Pétri contenant les explants ont été placées dans un incubateur à 37°C et à 5% de CO₂. Les milieux de culture ont été remplacés tous les deux jours sur une période d'environ trois à quatre semaines. Lorsque les CMLVH étaient devenues relativement confluentes, elles ont été collectées par trypsinisation. Les cellules ont ensuite été maintenues en culture dans du DMEM contenant 15% de SVF et utilisées entre les passages 4 à 9.

b) HUVEC

Les HUVEC ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC). Elles ont été cultivées dans des flasques coatées à la gélatine (0,2% de gélatine dans du PBS), dans un milieu de culture spécifique (Endothelial Cell Growth Medium-2», EGM-2, Lonza, Warkerville, USA) supplémenté par 2% de SVF. Les cellules ont été utilisées entre les passages 2 à 5.

Toxines urémiques

Les traitements ont été effectués en utilisant des concentrations urémiques cliniquement pertinentes d'indoxyle sulfate (IS, 200 μ M) et de phosphate de sodium monobasique (Pi, 3mM)²²¹. L'IS étant synthétisé en tant que sel de potassium, du KCl équimolaire a été utilisé comme témoin de la condition IS. Tous ces produits chimiques ont été achetés auprès de Sigma Aldrich. De plus, l'albumine étant la principale protéine de liaison de l'IS dans le plasma¹⁷⁷, nous avons ajouté de l'albumine humaine sérique à une concentration finale physiologique (Alb, 4%) afin de comparer l'effet cellulaire de IS en présence et en absence d'albumine.

Préparation des milieux conditionnés

Un jour avant le traitement, les HUVEC, à 80% de confluence, ont été placées dans un milieu de culture basique (Endothelial Basal Media-2, EBM-2) contenant 2% de SVF, 1% de P/S mais sans aucun supplément. Les HUVEC ont ensuite été traitées avec l'une des conditions suivantes: 2% SVF avec 0,2mM KCl seulement (pour étudier l'effet du milieu conditionné sans traitement avec KCl comme témoin pour le traitement par IS), 3mM Pi avec 0,2mM KCl, et 3mM Pi avec 200 μ M IS. Après 48h, les milieux des différentes conditions (maintenant appelés milieux

conditionnés des CE: EC-CM) ont été collectés, filtrés et stockés à -80°C afin d'être utilisés ensuite pour les études de calcification, le criblage de cytokines et l'analyse quantitative de facteurs sécrétés par ELISA (Enzyme Linked Immunosobant Assay). Le culot sec cellulaire a été conservé à -80°C pour l'extraction de l'ARN et la réalisation de RT-qPCR (Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction).

Induction de calcification

Les CMLVH ont été cultivées en routine dans du milieu DMEM additionné de 15% de SVF. À confluence, les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 48 puits en une moyenne de 15 000 cellules par puits et le milieu de culture a été changé le jour suivant. Préalablement, un test de prolifération et de viabilité au WST-1 a été réalisé sur des CMLV humaines en culture avec des proportions croissantes d'EC-CM mélangé au DMEM et n'a révélé aucun effet significatif de l'EC-CM pour tous les pourcentages de l'EC-CM inférieurs à 60%. Ensuite, pour les expériences suivantes, au jour du traitement, les CMLV humaines ont été incubées avec un nouveau milieu de culture préparé comme suit: 50% de DMEM mélangé avec 50% d'EC-CM ou 100% DMEM. Pour chaque condition urémique étudiée, le DMEM a été complété selon l'EC-CM correspondant (2% SVF témoin, 2% SVF + 0,2mM KCl, 2% SVF + 200µM IS, 2% SVF + 3mM Pi + 0,2mM KCl ou 2% SVF + 3mM Pi + 200µM IS). Le traitement a été suivi pendant 14 jours au cours desquels les milieux ont été changés tous les 2 jours. Le premier jour de culture des CMLVH dans les nouveaux milieux a été défini comme le jour 0.

Relation concentration-effet de l'IL-8

Les CMLVH ont été traitées en présence de 2% SVF avec des concentrations croissantes d'IL-8 humaine recombinante (0 à 30 pg/mL, Sigma Aldrich) seules ou en présence de 200 µM IS,

3 mM Pi + 0,2mM KCl, ou 3mM Pi + 200µM IS. La relation concentration-effet de l'IL-8 sur la calcification des CMLVH a été examinée après 14 jours de traitement. Pour les expériences RT-qPCR, IL-8 a été utilisée à une concentration de 15 pg/mL.

Transfection d'un siRNA IL-8

Les HUVEC ont étéensemencées dans des flasques de culture cellulaire de 75 cm² coatées à la gélatine et cultivées dans de l'EGM-2. À 70% de confluence, les HUVECs ont été rincées au PBS puis décollées par action de la trypsine (2mL/flasque). L'action de la trypsine a été neutralisée après 2 min par ajout d'EBM-2 à 10% SVF. Après 3 min de centrifugation à 800 rpm, le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire ainsi obtenu a été suspendu avec 100 µL de Nucléofector solution (Lonza) contenant 50 nM d'un petit ARN interférent ou «small interfering RNA» (siRNA) spécifique de l'IL-8 (IL-8 siRNA) ou bien contenant un siRNA comportant une séquence non-sens ou «scrambled siRNA» (scr siRNA) utilisé comme contrôle (Santa Cruz Biotechnology, USA). Les HUVECs en suspension ont été transférées par la suite dans des cuvettes fournies par le kit de Nucléofector (Lonza) en faisant attention à ne pas laisser des bulles d'air, et ces cuvettes ont été placées dans le système nucléofacteur Amaxa (Lonza) selon le protocole d'électroporation U-001 spécifique aux HUVEC. Suite à l'électroporation, les HUVECs ont été transférées dans des nouvelles flasques coatées à la gélatine et cultivées dans de l'EGM-2 et incubé pour 6 heures à 37°C et à 5% de CO₂. Après 6 heures, le milieu de culture des HUVECs a été jeté et remplacé par de l'EBM-2 supplémenté par l'une des deux conditions suivantes : 2% SVF, ou 2% SVF avec 3mM Pi et 200µM IS. Après 48 heures, les EC-CM ont été recueillis pour la détermination du pourcentage d'extinction de l'IL-8 par le test d'ELISA et pour une utilisation ultérieure dans l'induction de la calcification CMLVH. Les

culots cellulaires ont été également récupérés pour la détermination du pourcentage d'extinction de l'IL-8 par RT-qPCR après avoir extrait les ARN.

Anticorps neutralisant l'IL-8

Pour neutraliser l'IL-8 sécrétée par les HUVEC, l'IgG1 monoclonale de souris purifiée anti CXCL8/IL-8 humaine (MAB208, R&D Systems, Minneapolis, USA) a été ajoutée au milieu DMEM:EC-CM des CMLVH à une concentration finale de 5 ng/mL. L'effet neutralisant de cet anticorps vis-à-vis de l'IL-8 a été démontré sur un modèle de migration des cellules murines pro-B transfectées avec le récepteur humain CXCR2 de l'IL-8. Un isotype non spécifique IgG1 monoclonal de souris a été utilisé comme anticorps de contrôle (R&D System). Après 14 jours de traitement des CMLVH la calcification des CMLVH induite par l'EC-CM en présence de l'anticorps anti-IL-8 ou de l'anticorps isotype control a été évaluée.

Antagoniste des récepteurs de l'IL-8

Le SCH527123 (CliniSciences, Nanterre, France) est un puissant antagoniste allostérique des deux récepteurs CXCR1 et CXCR2 de l'IL-8, avec des valeurs d'IC₅₀ de 1000 nM et 3-6 nM respectivement. Cet antagoniste est utilisé dans divers modèles de rats²²² et est actuellement évalué dans des essais cliniques. Il a été ajouté aux milieux de culture DMEM:EC-CM des CMLVH à une concentration de 1 μM pour étudier l'effet du blocage des récepteurs de l'IL-8 sur la calcification des CMLVH induite par EC-CM après 14 jours de traitement, ou pour évaluer l'effet du blocage des récepteurs de l'IL-8 sur l'expression et la sécrétion d'OPN par les CMLVH.

Supplémentation en OPN

Afin d'évaluer le rôle de l'OPN dans la calcification des CMLVH favorisée par l'EC-CM, les CMLVH ont été cultivées dans le milieu DMEM:EC-CM supplémenté en OPN recombinante humaine (1433-OP, R&D System, Lille, France) de manière à restaurer le même niveau de concentration de l'OPN entre DMEM et DMEM:EC-CM pour chaque condition. La concentration de l'OPN additionnée à chaque condition DMEM:EC-CM a été calculée en se basant sur les résultats du kit ELISA OPN.

Supplémentation en ICAM-1

Afin de tester l'effet procalcifiant de l'ICAM-1 soluble dans notre modèle, les CMLVH ont été traitées en présence ou non de 20 ng/ml d'ICAM-1 (SRP3057, Sigma Aldrich) dans les conditions control, Pi, IS et Pi+IS. La concentration d'ICAM-1 a été calculée en se basant sur les résultats du cytokine array effectué sur l'EC-CM en présence de Pi+IS (cf. paragraphe correspondant), en tenant compte de la dilution 1:2 qui a lieu lorsque l'EC-CM est mélangé avec du DMEM.

Mesure de la calcification des CMLVH

Les CMLV ont étéensemencées dans des plaques à 48 puits en quadruplica pour chaque condition de traitement en une moyenne de 15000 cellules par puits; trois puits ont été réservés pour le marquage au Rouge Alizarine et un puits pour la quantification des protéines. Au jour 14 de traitement, les cellules ont été rincées une fois avec de l'éthanol à 50%, fixées avec de l'éthanol à 50% puis de l'éthanol à 100% pendant 5 minutes à chaque fois. Ensuite, 200µL d'Alizarine ont été ajoutés à chaque puits pendant 5 minutes puis rincés deux fois avec de

l'éthanol à 50%. A cet instant des photographies représentatives du marquage ont été prises dans chaque condition. Ensuite, afin d'extraire le Rouge Alizarine fixé par les dépôts calciques, 200µL de chlorhydrate de cétylpyridinium ont été ajoutés à chaque puits et les plaques ont été incubées 15 minutes en agitation douce. Le surnageant des puits a alors été transféré dans une plaque à 96 puits et la densité optique (DO) de chaque puits a été mesurée à 405 nm par le lecteur de plaques Multilabel Envision. En parallèle, le dosage des protéines a été réalisé par la méthode de Bradford (Bio-Rad DC) sur les puits dédiés pour chaque condition selon les instructions du fabricant. La calcification a été exprimée en normalisant l'absorbance mesurée par la concentration protéique dans chaque condition.

Cytokine Array

Afin de mesurer l'effet de Pi et IS sur la sécrétion par les CE de facteurs potentiellement impliqués dans la calcification vasculaire, un criblage utilisant un cytokine array capable de détecter et quantifier 40 cytokines et facteurs solubles (Réf QAH-BMA-1000, RayBiotech, Norcross, GA) a été réalisé sur les échantillons d'EC-CM cryoconservés à -80°C, en une seule procédure selon les instructions du fabricant. Le kit comprend 2 plaques capables de cribler les cytokines et facteurs solubles suivants: Activine A, aFGF, Amphireguline, bFGF, BMP-4, BMP-9, E-Selectine, ICAM-1, IGF-1, IL-1 alpha, IL-1 bêta, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17A, MCP-1, M-CSF, MIP-1 alpha, MMP-2, MMP-9, MMP-13, ostéoactivine, P-Cadhérine, RANK, SDF-1 alpha, Shh-N, TGFβ1, TGFβ2, TNFα, VCAM-1, VE-cadhérine, BMP-2, BMP-6, BMP-7, DKK-1, MMP-3, ostéoprotégérine, ostéopontine, PDGF-BB, TGFβ3 et TRANCE. Les lames contenant les spots d'anticorps permettant la capture des cytokines et facteurs solubles ont été incubées avec les échantillons d'EC-CM décongelés, puis ont été lavées et incubées avec un cocktail d'anticorps biotinylés dirigés contre les mêmes cytokines et facteurs solubles (méthode

sandwich). Les lames ont ensuite été incubées avec de la cyanine3 conjuguée à la streptavidine. La fluorescence relative a été détectée par le scanner de biopuce GenPix 4000A (Molecular Devices). Pour chaque cytokine et facteur soluble, la concentration dans l'échantillon a été calculée grâce à la courbe de calibration tracée à partir des résultats obtenus avec les échantillons standards fournis dans le kit.

ELISA

Les HUVEC ou CMLVH ont été cultivées dans des plaques à 48 puits. La concentration d'IL-8 sécrétée dans le milieu des HUVEC ou d'OPN dans le milieu des CMLVH, a été mesurée en utilisant des kits ELISA spécifiques selon le protocole des fabricants (ELH-IL8, RayBiotech, et RAB0436, Sigma Aldrich, respectivement). Brièvement, 100µL d'échantillon ou de standard ont été ajoutés en dupliqua dans la plaque à 96 puits coatés avec de l'anticorps primaire anti-IL-8 ou anti-OPN et incubés à 4°C pendant la nuit en agitation douce (1 cycle/seconde). Le lendemain, les solutions ont été jetées et la plaque lavée 4 fois avec la solution de lavage fournie dans le kit. Suite au dernier lavage, la plaque a été séchée par décantation et 100µL d'anticorps de détection ont été ajoutés dans chaque puit. Les puits ont été ensuite couverts et laissés sous faible agitation pendant 1 heure à température ambiante. Après incubation, la plaque a été lavée comme précédemment décrit et 100µL de Streptavidine a été ajoutée à chaque puits pour une durée de 45 min suivie par les lavages. Enfin, 100µL du «TMB One-step Substrate Reagent» ont été ajoutés dans chaque puits et la plaque a été couverte et incubée pendant 30 min à température ambiante et dans le noir avec une agitation douce puis 50µL de «Stop solution» ont été ajoutés aux puits contenant la «TMB One-step Substrate Reagent» et la DO de chaque puits a été immédiatement mesurée à 450 nm par le logiciel Envision Multilabel Reader. Les valeurs de DO obtenues dans les échantillons ont été interprétées en fonction des courbes de

calibration spécifiques (DO en fonction de la concentration) obtenues à partir des standards d'IL-8 ou d'OPN fournis dans les kits et dilués en série au moment de l'analyse.

Extraction des ARN

Les CMLVH ont été traitées dans des plaques à 6 puits, en moyenne de 200 000 cellules/puits et 400 000 cellules/condition. Les traitements ont été suivis pendant 48h, 7 jours ou 14 jours, pendant lesquels les milieux ont été renouvelés tous les 2 jours. À 48h, 7 ou 14 jours, les CMLVH ont été recueillies par trypsinisation, puis 350µL du tampon de lyse RLT avec 3,5µL de β-mercaptoéthanol ont été ajoutés aux échantillons et homogénéisés à l'aide de la pipette pour lyser les cellules d'une manière optimale. Ensuite, 350 µL d'éthanol à 70% ont été ajoutés et re-homogénéisés avec la pipette, et un volume total de 700µL a été transféré dans la colonne fournie par le kit QIAGEN et centrifugé à 8000 x g pendant 30 secondes. Le contenu du tube de collection a ensuite été vidé et 700µL de tampon RW1 a été ajouté dans la colonne suivie d'une centrifugation à 8000 x g pendant 30 secondes. Le contenu des tubes de collection a de nouveau été vidé et 500µL du tampon RPE dilué au 1:5 avec de l'éthanol pur a été ajouté à la colonne puis centrifugée. Cette dernière étape de lavage été répétée une deuxième fois. A la fin, le tube de collection été jeté et remplacé par un neuf sous la colonne et 20µL d'eau RNase-free été ajouté pour éluer les ARN dans le tube de collection après centrifugation à 4°C. Le dosage de l'ARN a été effectué en utilisant le spectrophotomètre NanoVue™ Plus (GE Healthcare) et les ARN ont été conservés à -80°C.

Transcription inverse

En utilisant le kit « High capacity cDNA reverse transcription » (Invitrogen), un volume équivalent à 1 µg d'ARN total a été ajouté à 10 µL du kit (sans inhibiteurs de RNase) et les volumes de la réaction ont été complétés à 20 µL avec de l'eau « RNase-free ». Le cycleur thermique a ensuite été chargé avec les échantillons et un cycle de 3 étapes a été exécuté. Étape 1 à 25°C pendant 10 minutes, étape 2 à 37°C pendant 120 minutes et étape 3 à 85°C pendant 5 minutes. Les ADN complémentaires (ADNc) obtenus ont été stockés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Des plaques à 96 puits ont été utilisées pour la qPCR. Les tubes de mélange ont été préparés comme suit: 0,5 µL d'amorce sens + 0,5 µL d'amorce anti-sens + 2,75 µL d'eau « RNase-free » + 6,25 µL de « Power SYBR® Green PCR Master Mix » (Fisher Scientific). Les séquences d'amorces sont listées dans le tableau 1. Dix µL de chaque mélange ont été ajoutés par puits. Les ADNc ont été dilués au 1:5 en utilisant de l'eau « RNase-free » et 2,5 µL de l'ADNc ainsi dilué a été ajouté par puits; chaque condition étant faite en dupliqua. Le thermocycleur Bio-Rad CFX Connect™ (Bio-Rad Laboratories) a servi pour la quantification en temps réel, et le logiciel Bio-Rad CFX Manager 3.1 a été employé pour l'analyse. Les données ont été interprétées selon la méthode deltaCT en utilisant la GAPDH comme gène de référence (pour lequel le niveau d'expression de l'ARN est resté constant dans les conditions expérimentales) et les résultats ont été normalisés aux niveaux d'expression du GAPDH.

Gène humain	Sequence d'amorces
GAPDH	Forward 5'-TCGGAGTCAACGGATTTGG-3' Reverse 5''-GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA-3''
IL-8	Forward 5'-CACTGCGCCAACACAGAAAT-3' Reverse 5''-CACCCAGTTTTTCCTTGGGGT-3''
RUNX2	Forward 5'-GGCCACAAATCTCAGATCGTT-3' Reverse 5''-CACTGGCGCTGCAACAAGAC-3''
BMP2	Forward 5'-CGGACTGCGGTCTCCTAA-3' Reverse 5''-GGAAGCAGCAACGCTAGAAG-3'
ALP	Forward 5'-CCTGGAGCTTCAGAAGCTCAA-3' Reverse 5''-ACTGTGGAGACACCCATCCC-3''
SM22α	Forward 5'-GATCCAACCTGGTTTATGAAGAAAGC-3' Reverse 5''-TCTAACTGATGATCTGCCGAGGTC-3''
SMMHC	Forward 5'-GAAAGGGATCTCCAAGCCCCG-3' Reverse 5''-CGTTGCTTTCGCTCGTCTTC-3''
αSMA	Forward 5'-CCAGCAGATGTGGATCAGCA-3' Reverse 5''-AAGCATTTGCGGTGGACAAT-3'
OPN	Forward 5'-ATCACCTGTGCCATACCAGTTAAAC-3' Reverse 5''-CCACAGCATCTGGGTATTTG-3''

Tableau 1: Séquences des amorces pour la quantification de l'expression des gènes humains

Modèle d'anneau aortique de rat

Les rats ont été manipulés conformément à la législation française et à la directive 2010/63/UE du Parlement Européen. Ils ont été hébergés dans des cages en polycarbonate et dans des chambres à température et humidité contrôlées avec un cycle de lumière/obscurité de 12h et ont eu un accès libre à l'eau et à la nourriture (Diet 2016, Harlan, Oxon, UK). Les aortes thoraciques ont été isolées à partir de rats mâles de type Wistar sauvage, d'environ 120-150 grammes, âgés de 7 à 8 semaines, après euthanasie par injection intrapéritonéale de pentobarbital (150 mg/kg).

La plupart des tissus conjonctifs ont été retirés avec soin et les aortes ont été découpées en anneaux de 2 à 3 mm. Les segments aortiques ont été traités pendant 7 jours avec du DMEM supplémenté de 10% SVF et l'une des conditions urémiques suivantes: 0,2mM KCl , 200µM IS, 3,8mM Pi + 0,2mM KCl ou de 3,8mM de Pi + 200µM de IS, en présence ou non de 1µM de SCH527123 (antagoniste des récepteurs CXCR1 et 2 de l'IL-8).

a) Mesure du calcium vasculaire

Après 7 jours de traitement, les anneaux aortiques ont été lavés au PBS et décalcifiés avec 300µL de 0,6N HCl pendant une nuit à 4°C afin de dissoudre les cristaux d'hydroxyapatite tissulaires. Le milieu de décalcification a été utilisé pour la détermination du calcium libre avec la méthode colorimétrique de l'o-crésolphtaléine-complexone (Sigma-Aldrich). Cette méthode est basée sur la réaction du calcium avec le complexone d'o-crésolphtaléine en solution alcaline, ce qui donne un complexe de couleur violette. L'intensité de la couleur formée, proportionnelle à la concentration en calcium dans l'échantillon, est lue à 570 nm par le lecteur de plaques Envision Multilabel. Les segments aortiques ont ensuite été séchés à 37 ° C pendant une nuit et pesés. Pour chaque condition, les résultats ont été exprimés en concentration de calcium par rapport à la masse sèche du segment aortique.

b) RT-qPCR

Après 7 jours de traitement, ses segments aortiques de rats ont été broyés en utilisant un broyeur de tissus motorisé G10 (Coyote Bio) et l'ARN a été extrait en utilisant le RNeasy® Mini Kit (QIAGEN). La RT-qPCR a été réalisée comme décrit ci-dessus. Les séquences d'amorces utilisées sont listées dans le tableau 2.

Gène murin	Sequences d'amorces
GAPDH	Forward 5'-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' Reverse 5''-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3''
CXCL1	Forward 5'-CCACACTCAAGAATGGTCGC-3' Reverse 5''-ACTTGGGGACACCCTTTAGC-3''
CXCL2	Forward 5'-TTGTCTCAACCCTGAAGCCC-3' Reverse 5''-CAGTTAGCCTTGCCTTTGTTCA-3''
OPN	Forward 5'-CGGTGAAAGTGGCTGAGTTT-3' Reverse 5''-GGCTACAGCATCTGAGTGTGTTG-3''

Tableau 2 : Séquences des amorces pour la quantification de l'expression des gènes murins

c) Immunohistochimie

Les anneaux aortiques ont été recueillis après 7 jours de traitement, rincés au PBS et incorporés dans un bloc OCT® (Tissue Tek, Californie, USA) pour assurer la cryoconservation. Les segments aortiques ont ensuite été congelés dans de l'isopentane froid et conservés à -80°C avant la cryosection. Une coloration au rouge d'alizarine ou une immunofluorescence ont été effectuées sur des coupes de 7µm comme décrit précédemment²²³. Pour la coloration au rouge d'alizarine, les lames SuperFrost (Menzel- Gläser, Brunswick, Germany) ont été incubées dans une solution d'Alizarin Red S (40 mmol/l, pH 4,2) pendant 2 min puis lavées et déshydratées avec de l'acétone 100%, avant d'être plongées dans un bain d'acétone-toluène (50:50). Les lames ont été ensuite lavées 5 fois dans du toluène 100% et séchées pendant quelques minutes avant d'être montées avec le milieu de montage neutre (DPX). Pour l'immunofluorescence, les tissus ont été lavés dans du PBS 1X, puis fixés pendant 5 min avec une solution de 4% de formaldéhyde diluée dans du PBS 1X, et perméabilisés, pendant 10 min, par une solution de 0,1 % de triton diluée dans du PBS 1% BSA. La fluorescence endogène a été éteinte par une incubation pendant 5 min dans une solution de 50 mM NH₄Cl préparée dans du PBS 1X. Les

lames ont été incubées pendant la nuit, à 4°C, avec l'anticorps monoclonal anti-OPN (AKm2A1, Santa Cruz, USA) dilué au 1:50 dans du PBS 0,5% BSA suite à une étape de 30 min de blocage dans du PBS 1% BSA. Le lendemain, les lames ont été lavées dans du PBS 1% BSA et incubées avec l'anticorps secondaire, produit chez la chèvre et conjugué à l'Alexa Fluor®588 (Invitrogen), après une dilution à 1:500 dans du PBS 0,5% BSA. La contre-coloration nucléaire a été réalisée en incubant les lames pendant 5 min à l'obscurité avec le Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) dilué au 1:8 dans du PBS 1 X et filtré deux fois. Après lavage au PBS 1X et à l'eau distillée, les lames ont été séchées et montées avec un liquide de montage pour fluorescence (Vectashield H-1000, Vector Laboratories). La fluorescence a été mesurée le lendemain à l'aide du microscope à fluorescence Zeiss imager.D2 (Microvision).

Analyses statistiques:

L'analyse statistique a été réalisée avec GraphPad Prism Version 6.01. Les données ont été exprimées en moyenne±écart type moyen (SEM). Le «Student t test» a été utilisé pour comparer 2 groupes de données, et la «one-way ANOVA» suivi du «post-hoc Tukey test» a été utilisé pour les comparaisons multiples. La «two-way ANOVA» a été utilisée pour étudier l'effet de la concentration de l'IL-8 sur la calcification des CMLVH. La valeur de p a été déterminée et les valeurs inférieures à 0,05, à 0,01, à 0,001 et à 0,0001 (*, **, ***, ****, respectivement) ont été considérées comme significatives.

Résultats

1. L'EC-CM aggrave l'effet de Pi/IS sur la calcification des CMLVH

Les résultats de calcification après 14 jours de traitement des CMLVH ont montré une augmentation significative du dépôt calcique par rapport à la condition contrôle, d'environ 2 fois lorsque les CMLVH étaient exposées à Pi (3 mM) et 3 fois lorsque les CMLVH étaient exposées à l'association Pi (3 mM) + IS (200 μ M) (n=5, p<0,05 et p<0,0001 respectivement, Figures 42A et 42B). De plus, le dépôt calcique mesuré avec l'association Pi+IS était significativement supérieur à celui mesuré avec le Pi seul (p<0,01). En revanche, IS (200 μ M) seul n'a pas eu d'effet significatif sur la calcification des CMLVH. L'effet de l'EC-CM (milieu conditionné des CE exposées aux toxines) sur la calcification des CMLVH après 14 jours de traitement a ensuite été évalué dans les conditions contrôle, Pi, IS et Pi+IS. Les résultats n'ont montré aucune augmentation significative de la calcification des CMLVH dans les conditions contrôle et IS en présence du milieu DMEM:EC-CM (50:50), comparé au DMEM seul. Cependant, une augmentation significative de la calcification des CMLVH a été observée dans les conditions Pi et Pi+IS (augmentation de 3,2 fois et 4,8 fois par rapport à la condition contrôle DMEM respectivement, n=5, p<0,0001, Figures 42A et 42B).

L'IS étant synthétisée sous la forme d'un sel de potassium, 0,2mM KCl a été utilisé comme témoin (dans les conditions contrôle et Pi seul). De plus, l'effet du KCl sur la calcification des CMLVH a été vérifiée et n'a montré aucune différence par rapport à la condition basale (milieu de culture de base commun à toute les conditions) (n=3, Figure 43A). Tenant compte du fait qu'*in vivo*, l'albumine est la principale protéine plasmatique de liaison à l'IS avec un taux de liaison qui dépasse 90%²²⁴, nous avons vérifié si la présence de 4% d'albumine sérique humaine (Alb) affecterait l'effet procalcifiant de Pi+IS sur les CMLVH. Les résultats n'ont montré aucune différence statistiquement significative avec ou sans 4% Alb (n=3, Figure 43B). Enfin, nous avons vérifié que le milieu de culture de base des CE (EBM-2), sans conditionnement cellulaire (c'est-à-dire n'ayant pas été en contact avec les CE), n'augmentait pas par lui-même l'effet procalcifiant de Pi+IS. Aucune différence significative de calcification n'a été observée selon que les CMLVH étaient exposées à Pi+IS dans le DMEM ou Pi+IS dans DMEM:EBM-2 (50:50) (n=3, Figure 43C).

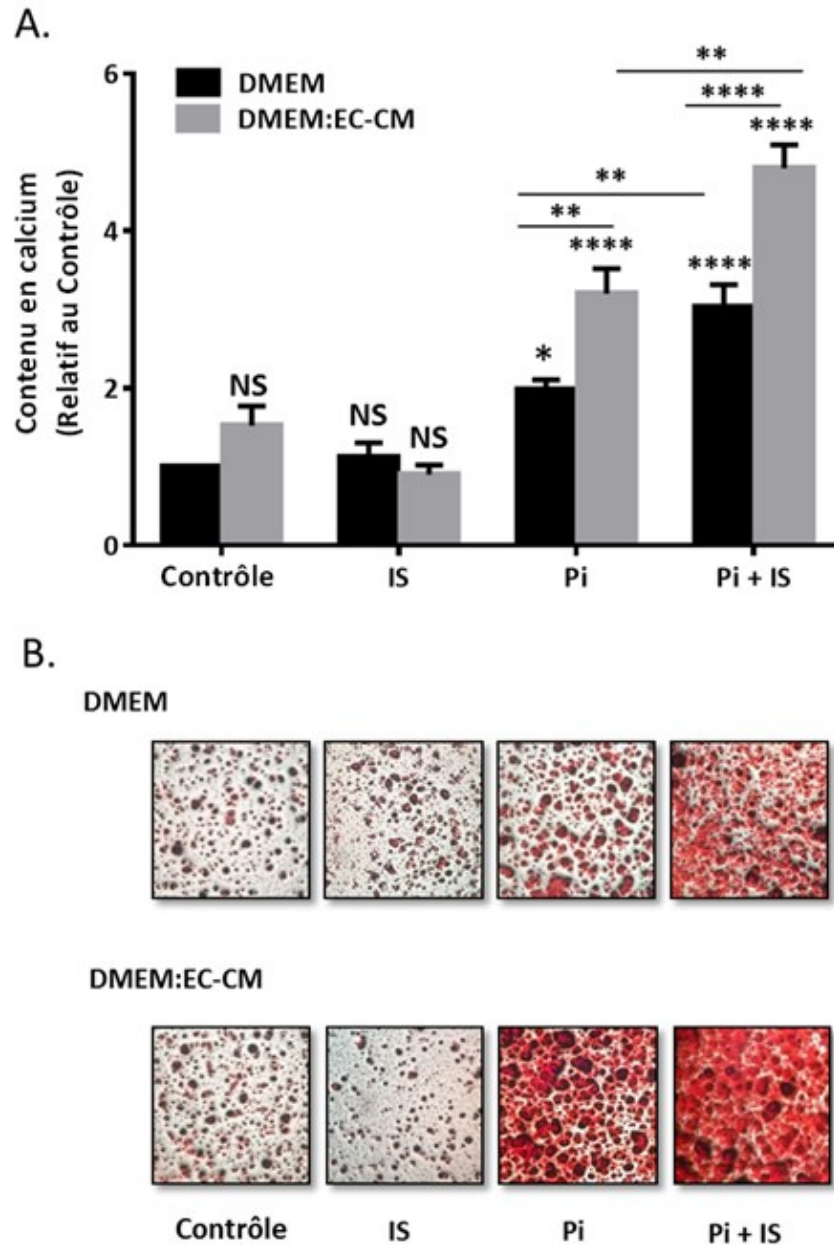


Figure 42: L'EC-CM aggrave l'effet de Pi et de Pi+IS sur la calcification des CMLVH

A et B. Quantification du dépôt calcique et photographie représentative du maraillage au rouge d'alizarine après 14 jours de traitement des CMLVH en présence de 3mM de Pi, de 200µM d'IS, ou les deux, avec ou sans supplémentation d'EC-CM aux mêmes conditions dans un rapport 50:50. Les résultats sont exprimés en moyenne±SEM, avec n=5, *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001 vs contrôle ou condition spécifique.

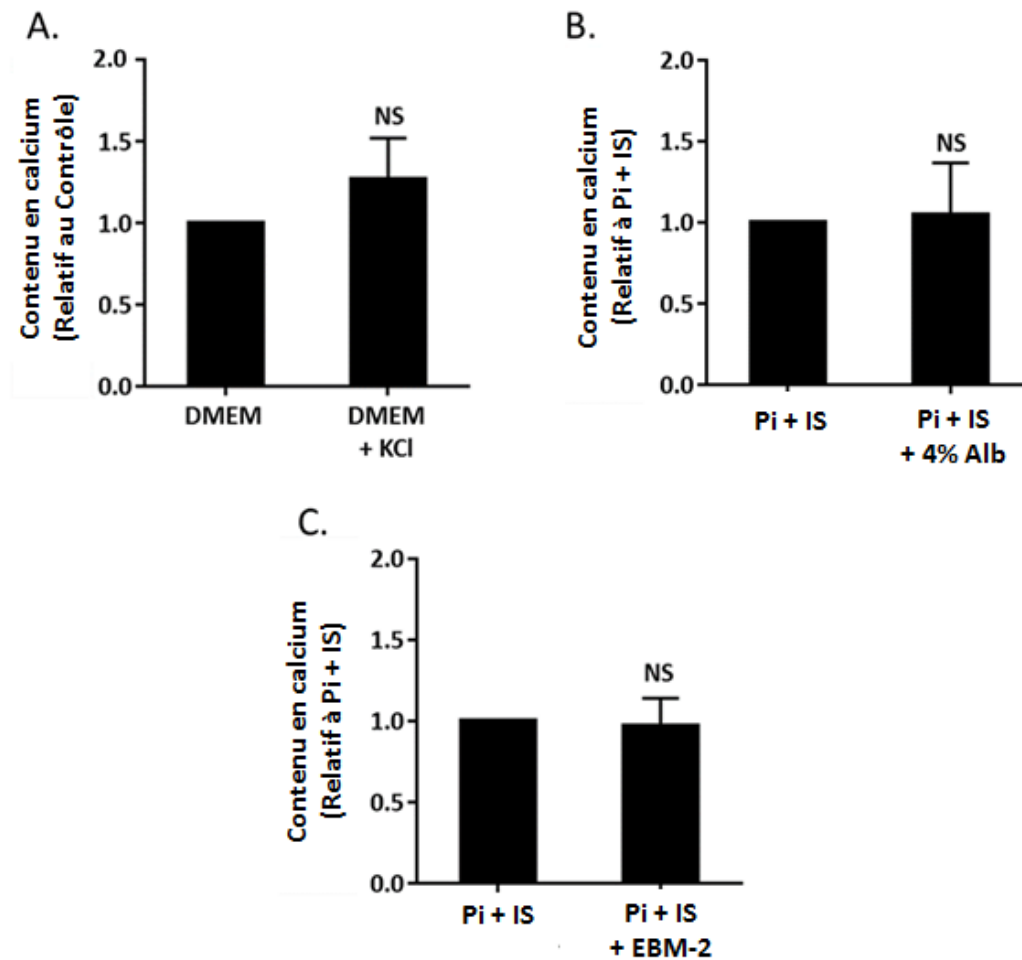


Figure 43: Effet du KCl, de l'albumine et du milieu de culture basal des CE sur la calcification des CMLVH

A, B et C. Quantification du dépôt calcique après 14 jours de traitement des CMLVH avec respectivement 0,2mM de KCl, ou Pi+IS en présence de 4% d'Alb, ou Pi+IS supplémenté par le milieu de culture basal des CE (EBM-2) sans aucun conditionnement, dans un rapport 50:50. Les résultats sont exprimés en moyenne±SEM, avec n=3.

2. Pi+IS induit l'expression et la sécrétion d'IL-8 à partir des CE

Afin d'identifier les facteurs sécrétés par les CE qui stimuleraient la calcification produite par les CMLVH, une biopuce à cytokines (cytokine array) capable de détecter et quantifier 40 cytokines ou facteurs solubles impliqués dans le métabolisme osseux a été tout d'abord utilisé en analysant les échantillons d'EC-CM. Les résultats ont montré que les CE exposées à Pi ou Pi+IS présentaient une augmentation de la sécrétion d'IL-8 par rapport à la condition contrôle, qui n'était statistiquement significative que dans la condition Pi+IS (n=3, p=0,0164, Tableau 3). L'analyse du cytokine array a également mis en évidence une augmentation significative de la sécrétion d'ICAM-1 soluble par les CE exposées à Pi+IS (n=3, p=0,0026, Tableau 3). Les autres cytokines recherchées par le cytokine array n'ont pas montré de variation significative de leur concentration dans les différentes conditions ou bien les concentrations étaient inférieures à la limite de quantification du kit (donc en très faible concentration dans l'EC-CM).

Cytokine	Contrôle	3 mM Pi	3mM Pi + 50 µg/mL IS	p (ANOVA)
Activin A (pg/mL)	6875 ± 6193	3693 ± 3128	400 ± 274,2	0,2218
AR (pg/mL)	1,02 ± 0,98	4,59 ± 5,22	1,15 ± 3,89	0,5525
BMP-2 (pg/mL)	0,84 ± 0,35	0,75 ± 0,1	0,73 ± 0,45	0,9286
BMP-4 (pg/mL)	41,86 ± 25,21	42,96 ± 23,58	41,24 ± 22,29	0,996
BMP6 (pg/mL)	772,13 ± 348,9	614,91 ± 113	658,56 ± 177,57	0,7136
BMP7 (pg/mL)	476,97 ± 407,82	840,43 ± 74,75	424,15 ± 282,73	0,2388
DKK-1 (µg/mL)	1,40 ± 1,11	1,16 ± 1,52	1,29 ± 0,59	0,9665
E-Selectin (pg/mL)	9,14 ± 6,16	19,85 ± 12,94	30,75 ± 15,61	0,1773
ICAM-1 (ng/mL)	9,35 ± 8,08	9,05 ± 1,53	40,74 ± 10,18	0,0026
IGF-1 (pg/mL)	127,33 ± 74,24	191,88 ± 126,98	250,52 ± 142,86	0,4871
IL-6 (pg/mL)	105,37 ± 157,89	190,67 ± 154,71	95,02 ± 141,91	0,7122
IL-8 (pg/mL)	1,34 ± 0,18	4,55 ± 3,56	17,52 ± 7,89	0,0164
MCP-1 (pg/mL)	685,39 ± 174,49	753,09 ± 485,51	1117,77 ± 335,2	0,3429
MMP-2 (pg/mL)	51,82 ± 9,70	102,42 ± 45,83	75,39 ± 13,05	0,3448
MMP-3 (pg/mL)	1110 ± 214,9	1563 ± 797,1	1154 ± 218,6	0,656
OPG (pg/mL)	172,5 ± 232,6	270,9 ± 272,4	256,4 ± 285,6	0,8972
OPN (pg/mL)	9,35 ± 4,18	4,79 ± 1,98	7,72 ± 8,94	0,6449
PDGF-BB (pg/mL)	272,67 ± 187,08	346,8 ± 107,07	380,08 ± 113,41	0,6526
SDF-1a (pg/mL)	445,75 ± 464,15	1069,45 ± 835,62	1066 ± 1141,66	0,5935

Tableau 3: Les CE sous l'effet de Pi+IS sécrètent de l'IL-8 et de l'ICAM-1 soluble

Un criblage par cytokine array a permis la recherche et la quantification dans l'EC-CM de quarante cytokines impliquées dans le métabolisme osseux. L'analyse a été effectuée à partir de trois lots différents d'HUVEC, chaque lot étant un pool d'HUVEC provenant de quinze à vingt donneurs différents. Seules les valeurs de concentrations supérieures aux limites de quantification sont rapportées et exprimées en moyenne±écart-type.

Parallèlement une analyse par ELISA du milieu de culture des CE a révélé une augmentation de la concentration d'IL-8 sous l'effet de l'IS. Cet effet de l'IS était concentration-dépendant et n'était pas significativement limité par la présence de 4% d'albumine (n=3, Figure 44A). Cependant, l'effet produit par l'IS a été amplifié de manière significative par l'addition de 3 mM de Pi pour les concentrations d'IS comprises entre 40 et 400µM (n=3, Figure 44A). D'autre part, la libération d'IL-8 n'a pas été affectée par la présence de Pi seul quelque soit sa concentration entre 0,9 et 5 mM (n=3, Figure 44B).

Finalement, la RT-qPCR a montré que l'IS et l'association Pi+IS, mais pas le Pi seul, augmentaient significativement l'expression du gène de l'IL-8 d'environ 1,7 et 2,4 fois, respectivement, par rapport à la condition contrôle (Figure 44C).

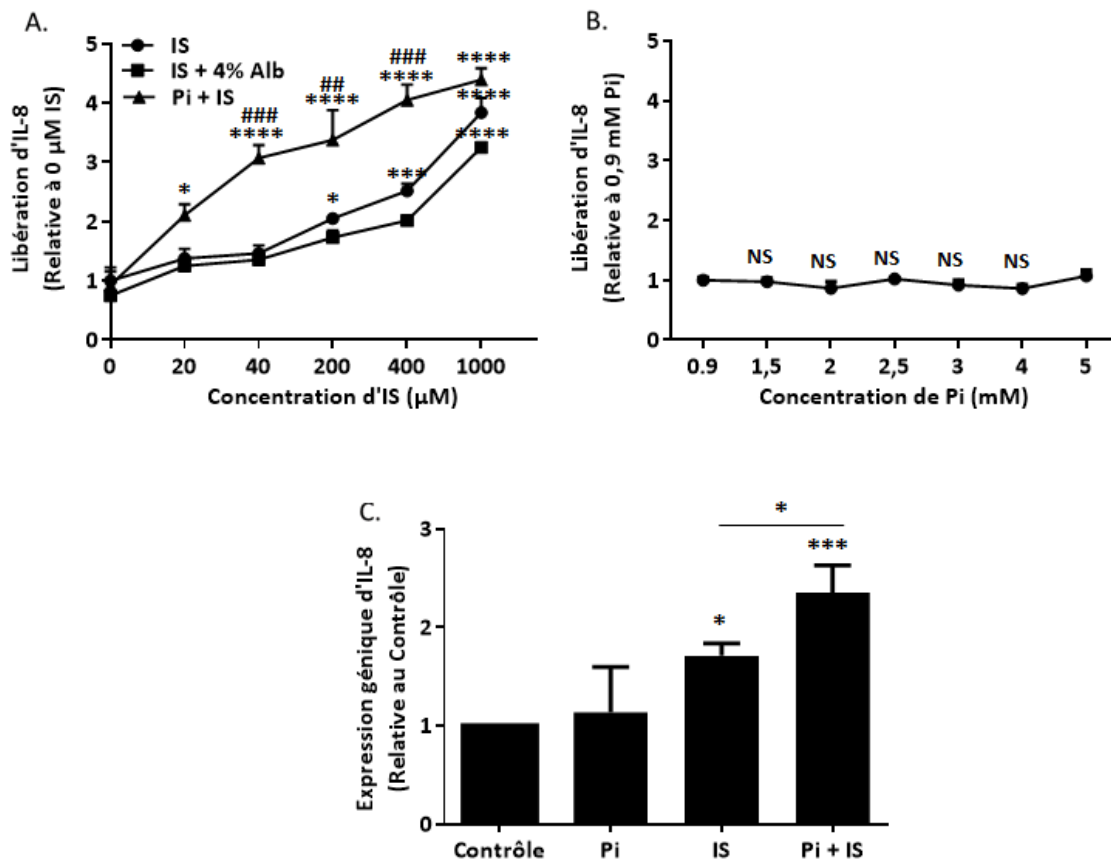


Figure 44: Pi+IS induit l'expression et la sécrétion d'IL-8 par les CE

A. ELISA effectué sur les EC-CM montrant la libération de l'IL-8 par les HUVEC exposées à des concentrations croissantes d'IS, en présence ou non de 4% Alb ou de Pi. Les résultats sont exprimés en moyenne±SEM, n=3. * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 vs 0 µg/mL IS, ###p<0,01, ###p<0,001 vs la même concentration d'IS.

B. ELISA effectué sur les EC-CM montrant la libération de l'IL-8 par les HUVEC exposées à des concentrations croissantes de Pi. Les valeurs sont la moyenne±SEM, n=3.

C. RT-qPCR montrant les niveaux d'expression de l'ARNm de l'IL-8 dans les HUVEC après 2 jours de traitement par Pi, IS, et Pi+IS. Les résultats sont exprimés en moyenne±SEM, n=3. * p <0,05, *** p <0,001 vs la condition correspondante.

3. L'IL-8 est responsable de la calcification induite par l'EC-CM

Afin d'étudier l'implication de l'IL-8 dans la calcification des CMLVH, celles-ci ont été traitées avec des concentrations croissantes d'IL-8 (de 0 à 30 pg/mL), seule ou en présence de Pi, IS ou Pi+IS. Les résultats ont montré que l'IL-8 induisait une augmentation significative du dépôt calcique de manière concentration-dépendante dans la condition Pi+IS (n=3, p<0,05, Figure 45).

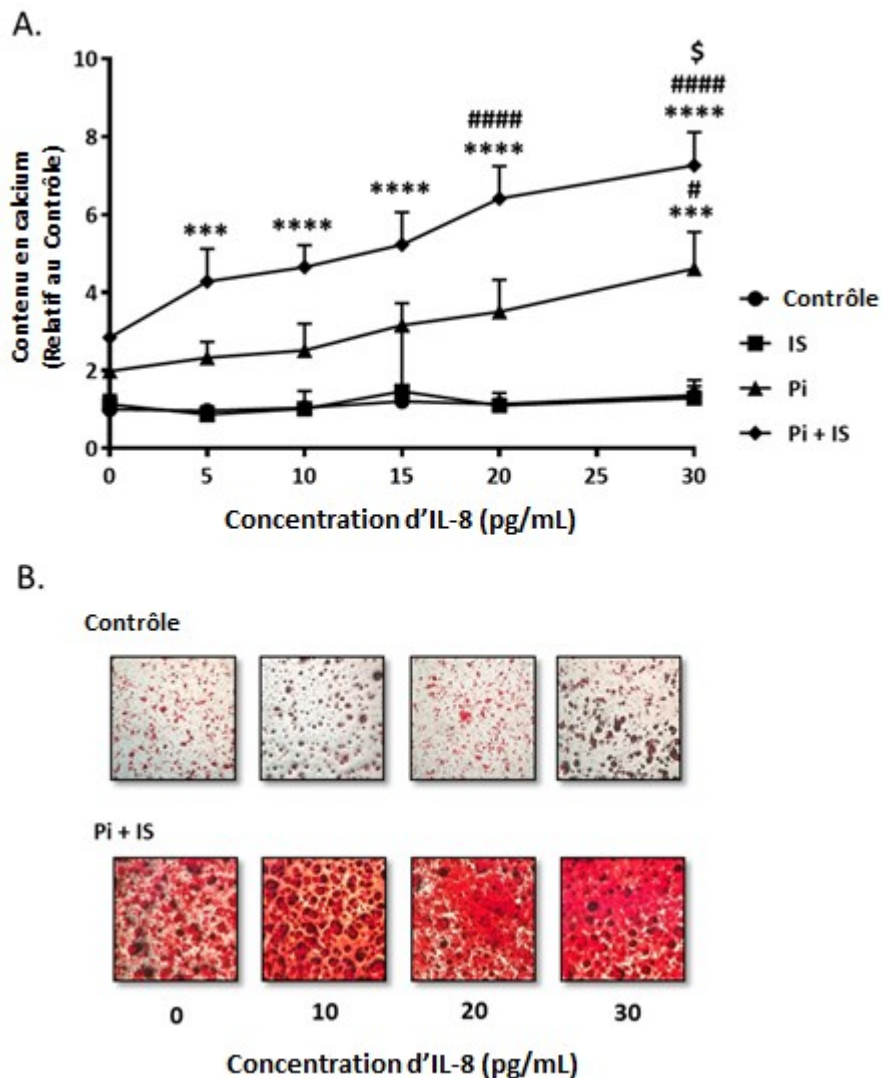


Figure 45: IL-8 accentue l'effet de Pi et de Pi+IS sur la calcification des CMLVH.

*A et B. Quantification du dépôt calcique et photographie représentative du marquage au rouge d'alizarine après 14 jours de traitement des CMLVH en présence de 3mM Pi, ou de 200µM IS, ou les deux, et d'une concentration croissante d'IL-8 (de 0 à 30 pg/mL). Les résultats sont exprimés en moyenne±SEM sur n = 3 expériences indépendantes. ***p <0,001, ****p <0,0001 vs 0 pg/ml d'IL-8 dans l'état basal; #p<0.05, #####p<0.0001 vs. 0 pg/ml d'IL-8 dans la même condition urémique; \$p<0,05 vs. 10 pg/mL d'IL-8 en condition Pi+IS.*

Ensuite, pour vérifier si l'IL-8 serait responsable de la calcification des CMLVH induite par l'EC-CM, un anticorps neutralisant anti-IL-8 a été ajouté au milieu DMEM:EC-CM (50:50). Cet anticorps anti-IL-8 a significativement empêché ($p < 0,05$) l'effet induit par l'EC-CM sur la calcification des CMLVH dans la condition urémique Pi+IS par rapport à la condition contrôle ($1,7 \pm 0,46$ vs. $3,1 \pm 0,38$ respectivement, $n=4$, Figure 46A). De même, l'ajout de l'antagoniste SCH527123 des récepteurs de l'IL-8 (CXCR1/2) a significativement réduit ($p < 0,0001$) la calcification induite par l'EC-CM dans les conditions Pi+IS par rapport à la condition contrôle ($1,8 \pm 0,25$ vs. $4,2 \pm 0,45$ respectivement, $n=3$, Figure 46B).

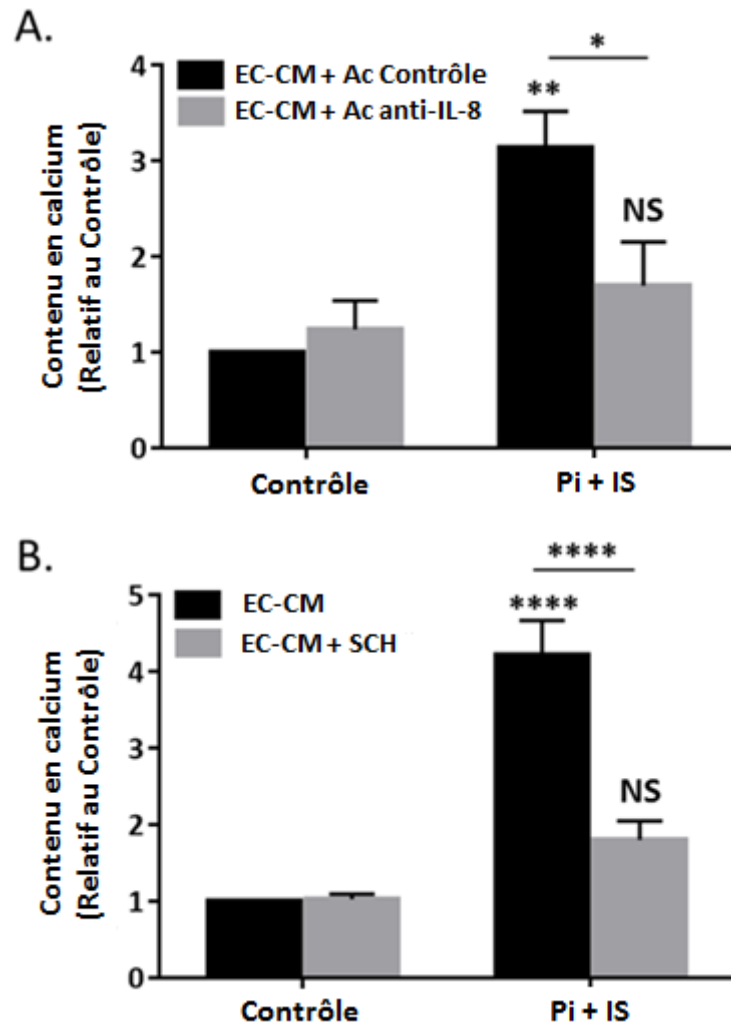


Figure 46: L'IL-8 est responsable de la calcification induite par l'EC-CM

A et B. Quantification du dépôt calcique montrant l'effet de l'ajout de 5 ng/mL d'un anticorps neutralisant anti-IL-8 ou de 1 μ M de l'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 (CXCR1/2) SCH527123 (SCH) sur les CMLVH induites par l'EC-CM en condition Pi+IS. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, n=4 et n=3 respectivement. * p <0,05, ** p <0,01, **** p <0,0001.

D'autre part, pour confirmer que l'effet promoteur de l'EC-CM sur la calcification serait bien dû à la sécrétion d'IL-8 par les CE, ces dernières ont été transfectées avec 50 nM d'un siRNA IL-8 ou 50 nM d'un siRNA contrôle puis traitées pendant 48h avec l'association Pi+IS. La transfection a été validée par RT-qPCR et ELISA montrant une réduction de 96,2% et 60,4% de l'expression du gène de l'IL-8 et de la sécrétion de l'IL-8 respectivement grâce au siRNA IL-8, par comparaison au siRNA contrôle (n=3, Figures 47A et B respectivement).

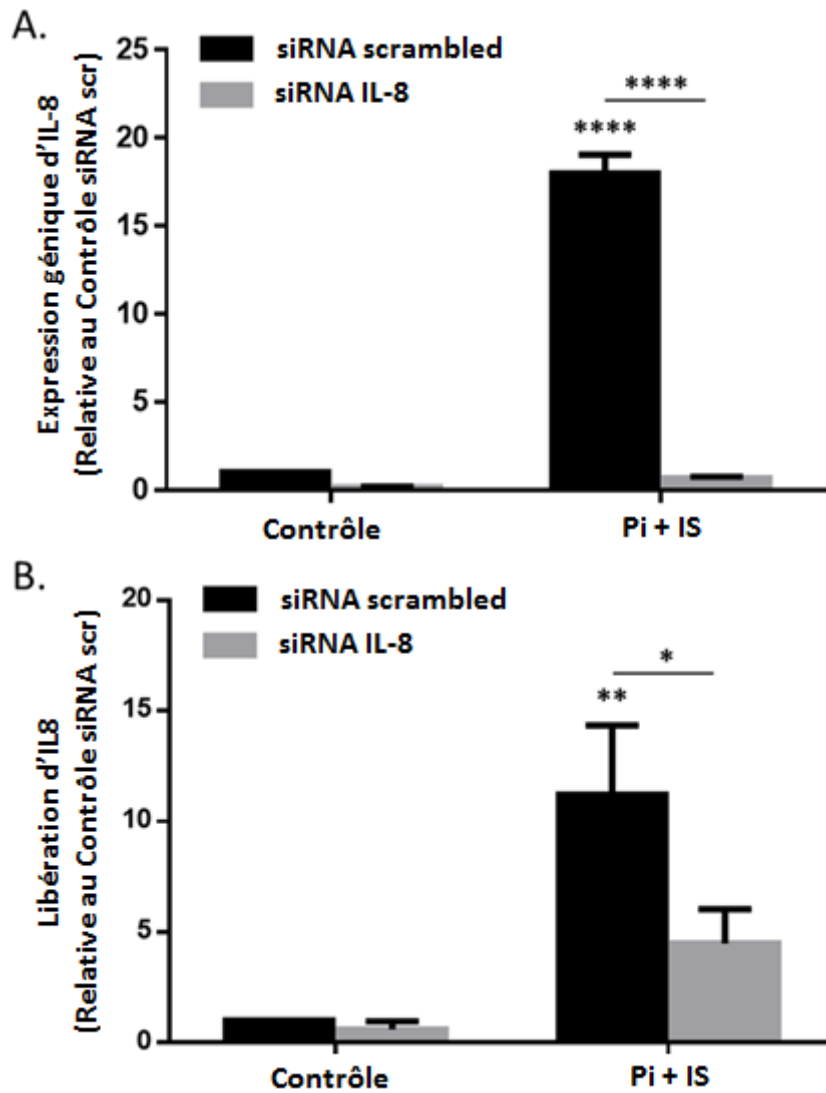


Figure 47: La transfection d'un siRNA IL-8 inhibe significativement l'expression de l'IL-8 dans les HUVEC

A. RT-qPCR après 2 jours de traitement des HUVEC montrant l'expression du gène de l'IL-8 dans les HUVEC après transfection par le siRNA IL-8 par rapport au siRNA contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne±SEM. n=3. ****p<0,0001 vs control ou condition spécifique.

B. ELISA effectué sur le surnageant des HUVEC après 2 jours de traitement montrant la sécrétion de l'IL-8 par les HUVEC après transfection par le siRNA IL-8 par rapport au siRNA contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne±SEM. n=3. *p<0,05, **p<0,01 vs contrôle ou condition spécifique.

Ensuite, la calcification des CMLVH induite par l'EC-CM dans la condition Pi+IS a été significativement abolie ($p < 0,0001$) en utilisant l'EC-CM collecté des CE transfectées avec le siRNA IL-8 par comparaison avec l'EC-CM collecté des CE transfectées avec du siRNA scrambled ($0,64 \pm 0,04$ vs. $2,94 \pm 0,09$ respectivement) ($n=4$, Figure 48).

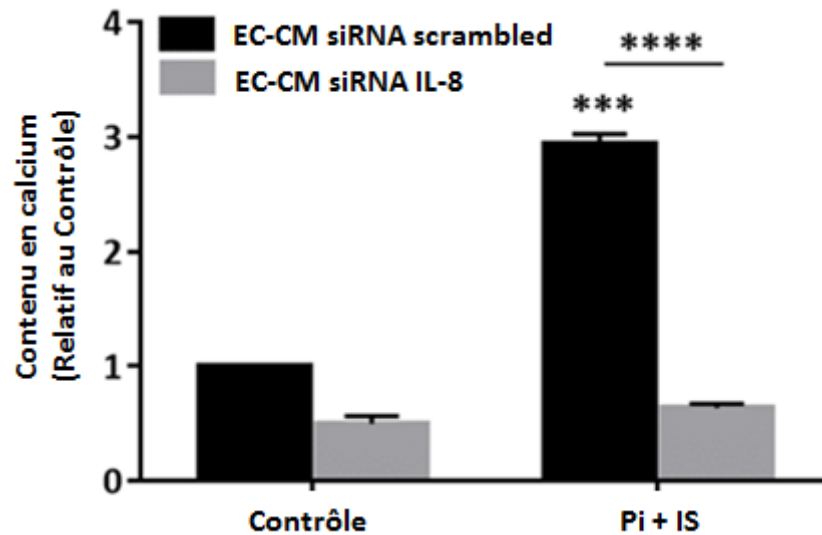


Figure 48: La calcification induite par l'EC-CM provient de l'IL-8 exprimée par les HUVEC

Quantification du dépôt calcique montrant l'effet de la transfection des HUVEC par le siRNA IL-8 sur la calcification des CMLVH induite par l'EC-CM. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n=4$.

**** $p < 0,0001$ vs EC-CM recueillies après transfection des HUVECs avec un siRNA contrôle.

4. L'IL-8 n'accentue pas la transdifférenciation ostéogénique induite par les toxines urémiques

Afin d'examiner le rôle de l'IL-8 dans la transdifférenciation ostéogénique des CMLVH induite par les toxines urémiques, les marqueurs précoces et tardifs de ce changement phénotypique ont été analysés par RT-qPCR après 2, 7 ou 14 jours de traitement. Par rapport au contrôle, l'association Pi+IS a significativement augmenté l'expression des marqueurs ostéogéniques RUNX2 après 2 jours ($1,52 \pm 0,02$, $p < 0,05$, Figure 49A), BMP2 après 7 jours ($2,38 \pm 0,23$, $p < 0,001$, Figure 49B) et ALP après 7 jours ($1,96 \pm 0,17$, $p < 0,05$, Figure 50C). En ce qui concerne les marqueurs contractiles, Pi+IS a significativement réduit ($p < 0,05$) l'expression de SM22 α ($0,75 \pm 0,05$), SMMHC ($0,75 \pm 0,05$) et α SMA ($0,65 \pm 0,10$) au jour 14, par rapport aux contrôles (Figure 49D, 4E et 4F, respectivement). Tous ces effets n'étaient pas significativement modulés par la présence d'IL-8.

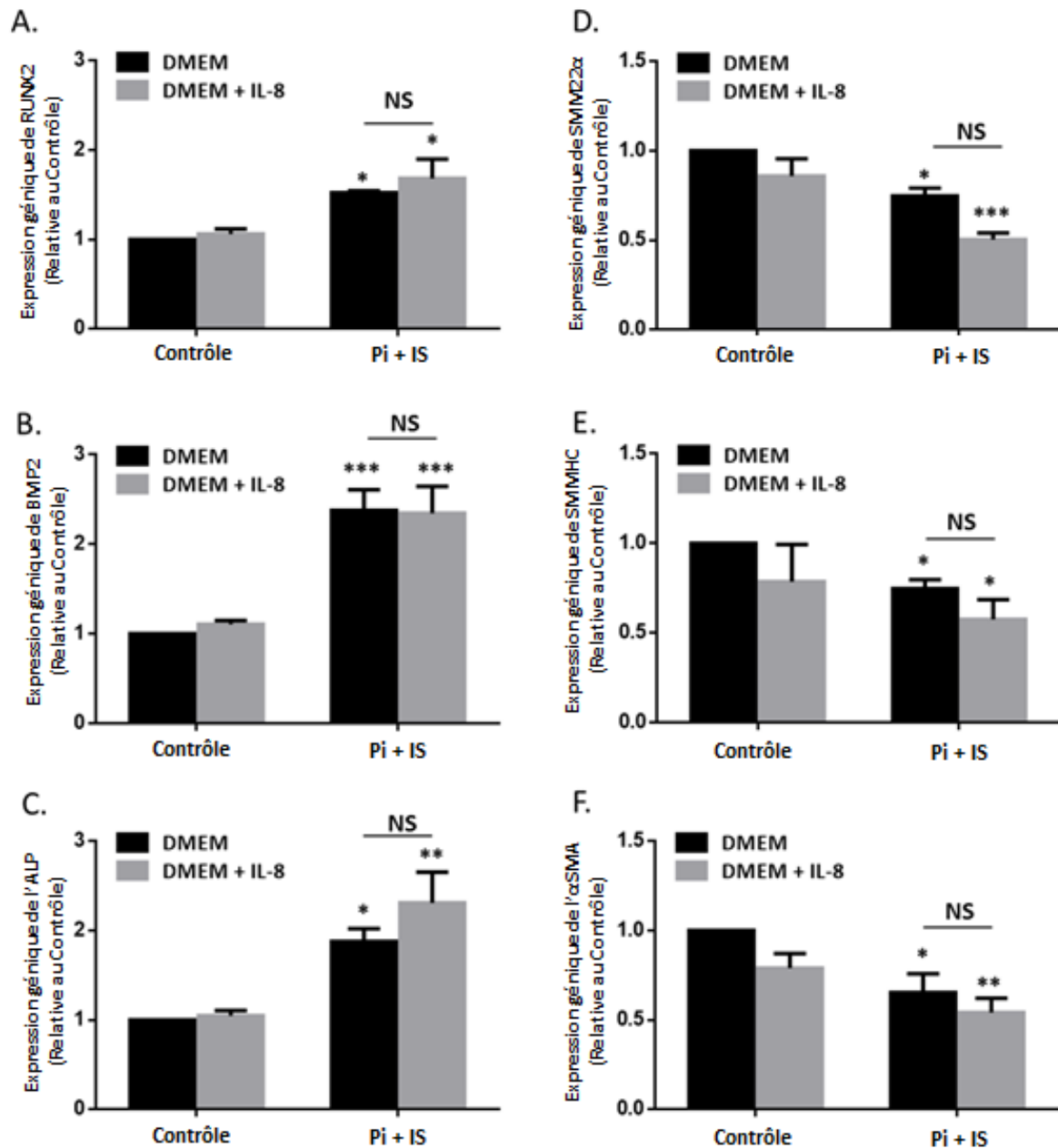


Figure 49: L'IL-8 n'accroît pas la transdifférenciation ostéogénique des CMLVH induite par Pi+IS

A. Le niveau d'expression de l'ARNm du marqueur ostéogénique RUNX2 après 2 jours de traitement augmente en présence de Pi+IS.

B et C. Les niveaux d'expression de l'ARNm des marqueurs ostéogéniques BMP2 et ALP après 7 jours de traitement augmentent dans la condition Pi+IS.

D, E et F. Les niveaux d'expression de l'ARNm des marqueurs contractiles SM22α, SMMHC et αSMA après 14 jours de traitement diminuent en présence de Pi+IS.

Les résultats sont exprimés en moyenne±SEM. n=3. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs Contrôle.

5. L'IL-8 empêche l'augmentation de l'expression et de la sécrétion d'OPN par les CMLVH

L'expression d'un autre marqueur de différenciation ostéogénique, l'OPN, a également été étudiée. La RT-qPCR (Figure 50A) et l'ELISA (Figure 50D) ont été menées sur les CMLVH et leurs milieux de culture après 2 jours de traitement. Les résultats ont montré que Pi+IS augmentait significativement l'expression et la sécrétion d'OPN de $\sim 1,9$ et $\sim 3,3$ fois comparé à la condition contrôle ($p < 0,001$ et $p < 0,0001$, respectivement).

Parallèlement, le milieu conditionné des CE exposées à Pi+IS a empêché significativement l'augmentation des niveaux d'ARNm d'OPN et de l'OPN sécrétée par les CMLVH, comparé à l'absence d'EC-CM ($0,82 \pm 0,14$ et $1 \pm 0,08$ respectivement, $p < 0,0001$, Figures 50A et 50D). De la même manière, le traitement direct des CMLVH exposées à Pi+IS par IL-8 a limité significativement l'induction de l'expression d'OPN et de sa sécrétion ($1,19 \pm 0,06$ et $1,02 \pm 0,025$ respectivement, $p < 0,0001$, Figures 50B et 50E). À l'inverse, lorsque l'antagoniste SCH527123 des récepteurs de l'IL-8 (CXCR1/2) a été ajouté à l'EC-CM, les niveaux d'ARNm d'OPN et sa sécrétion par les CMLVH en présence de Pi+IS ont été significativement augmentés de $\sim 1,9$ et $\sim 3,6$ fois, respectivement, par rapport à l'absence d'antagoniste (Figures 50C et 50F, respectivement).

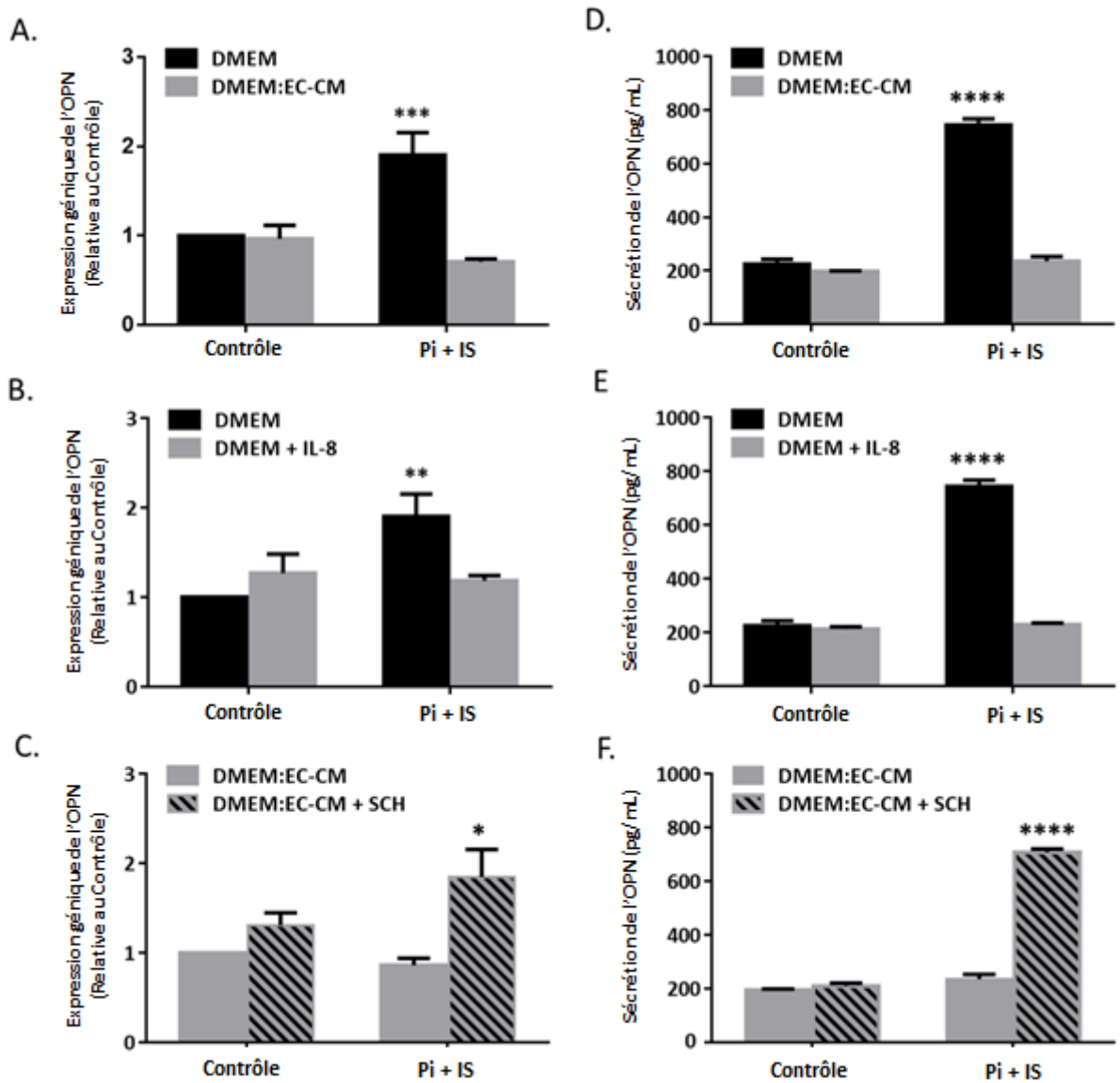


Figure 50: L'IL-8 empêche l'induction de l'OPN par le Pi+IS dans les CMLVH

RT-qPCR (à gauche) et ELISA (à droite) menées sur les CMLVH et leurs milieux de culture après 2 jours de traitement.

A et D. Effet de l'EC-CM sur l'expression de l'ARNm de l'OPN et la sécrétion de l'OPN.

B et E. Effet de l'IL-8 sur l'expression de l'ARNm de l'OPN et la sécrétion de l'OPN.

C et F. Effet de l'antagoniste SCH527123 (SCH) des récepteurs de l'IL-8 ajouté à l'EC-CM sur l'expression de l'ARNm de l'OPN et la sécrétion de l'OPN.

Les résultats sont exprimés en moyenne±SEM, n=3 pour la RT-qPCR, n=5 pour l'ELISA, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 vs Contrôle.

De plus, lorsque l'OPN est ajoutée à l'EC-CM, la calcification des CMLVH induite par l'EC-CM a été significativement prévenue, comparée à l'absence d'OPN ($0,91 \pm 0,24$ vs. $4,40 \pm 0,32$ respectivement, $p < 0,001$, Figure 51).

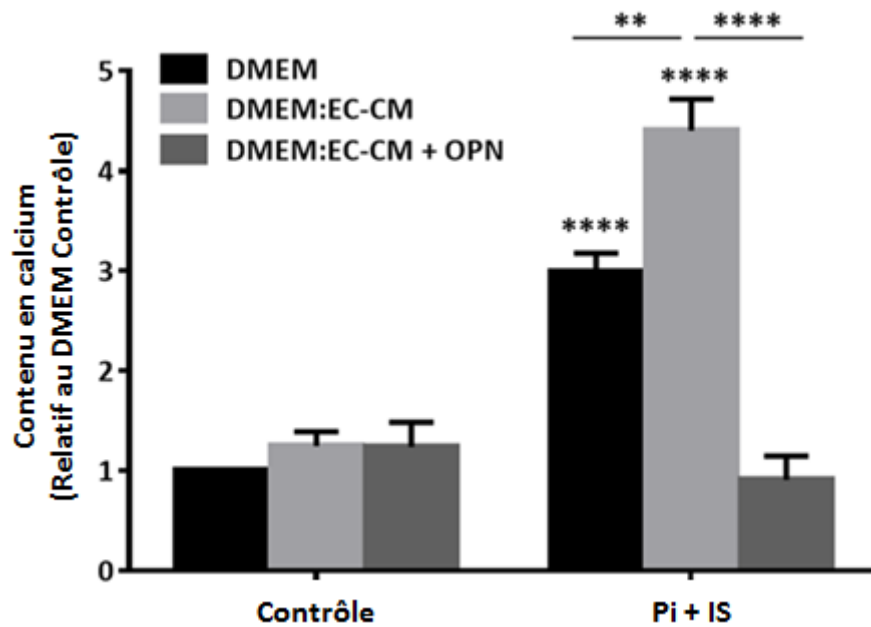


Figure 51: La supplémentation d'OPN empêche la calcification des CMLVH induite par Pi+IS

Quantification du dépôt calcique après 14 jours de traitement des CMLVH par l'EC-CM supplémenté en OPN. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $n=3$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs contrôle ou condition spécifique.

6. L'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 inhibe la calcification des anneaux aortiques de rat

Afin d'évaluer la calcification à l'échelle tissulaire, des anneaux aortiques de rats ont été également exposés à Pi et IS. Les anneaux aortiques ont montré une augmentation significative de la calcification tissulaire, mesurée par la teneur en calcium après 7 jours de traitement, par Pi et dans une plus grande mesure par Pi+IS comparé à la condition contrôle (40 ± 6 et 67 ± 7 vs. $2 \pm 0,2$ $\mu\text{g Ca/mg}$ d'anneau aortique respectivement, $p < 0,0001$, Figure 52).

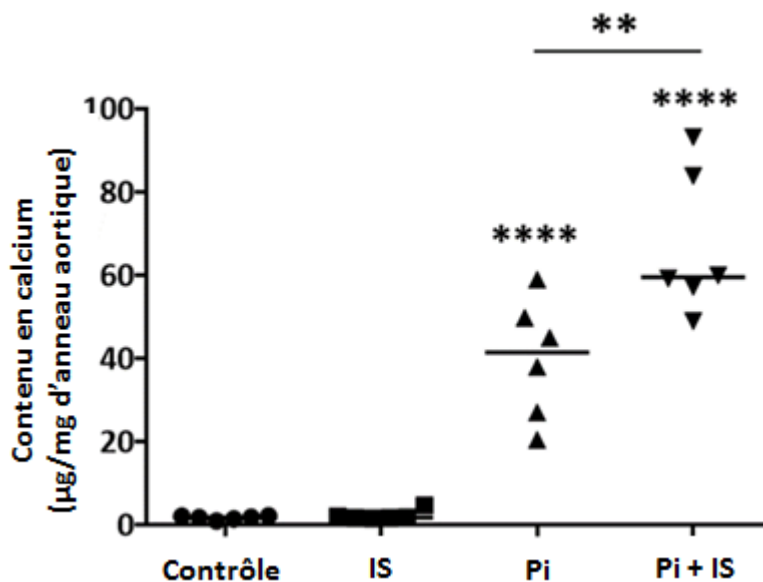


Figure 52: Pi et Pi+IS induisent la calcification des anneaux aortiques de rats

Dosage du calcium tissulaire après 7 jours de traitement des anneaux aortiques par $3,8\text{mM}$ Pi, et $3,8\text{mM}$ Pi+ $200\mu\text{M}$ IS. $n=6$. $**p < 0,01$, $****p < 0,0001$ vs Contrôle.

En parallèle, la RT-qPCR a montré que l'association Pi+IS augmente d'environ 2,1 et 1,6 fois l'expression génique des homologues de l'IL-8 chez le rat, le CXCL1 et le CXCL2 respectivement, par rapport aux contrôle ($p < 0,001$ et $p < 0,05$ respectivement, Figure 53).

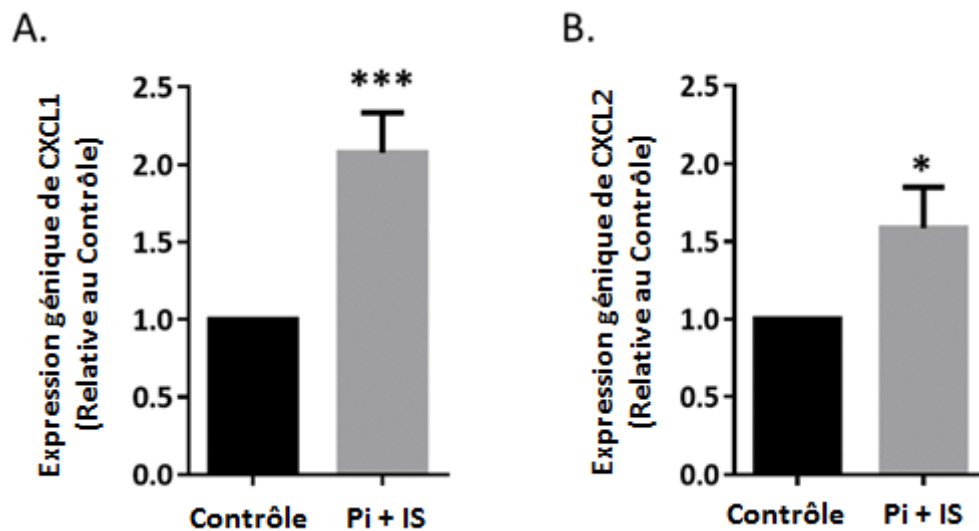


Figure 53: Pi+IS induit l'expression des homologues de l'IL-8 chez le rat

A et B. RT-qPCR montrant l'expression des ARNm de CXCL1 et CXCL2 (homologues de l'IL-8) respectivement, dans les anneaux aortiques de rat après 7 jours d'exposition à Pi+IS. n=8. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs Contrôle.

En outre, l'addition de l'antagoniste SCH527123 des récepteurs de l'IL-8 (CXCR1/2) a réduit d'environ 42% la calcification des anneaux aortiques induite par Pi+IS ($p < 0,0001$, Figure 54).

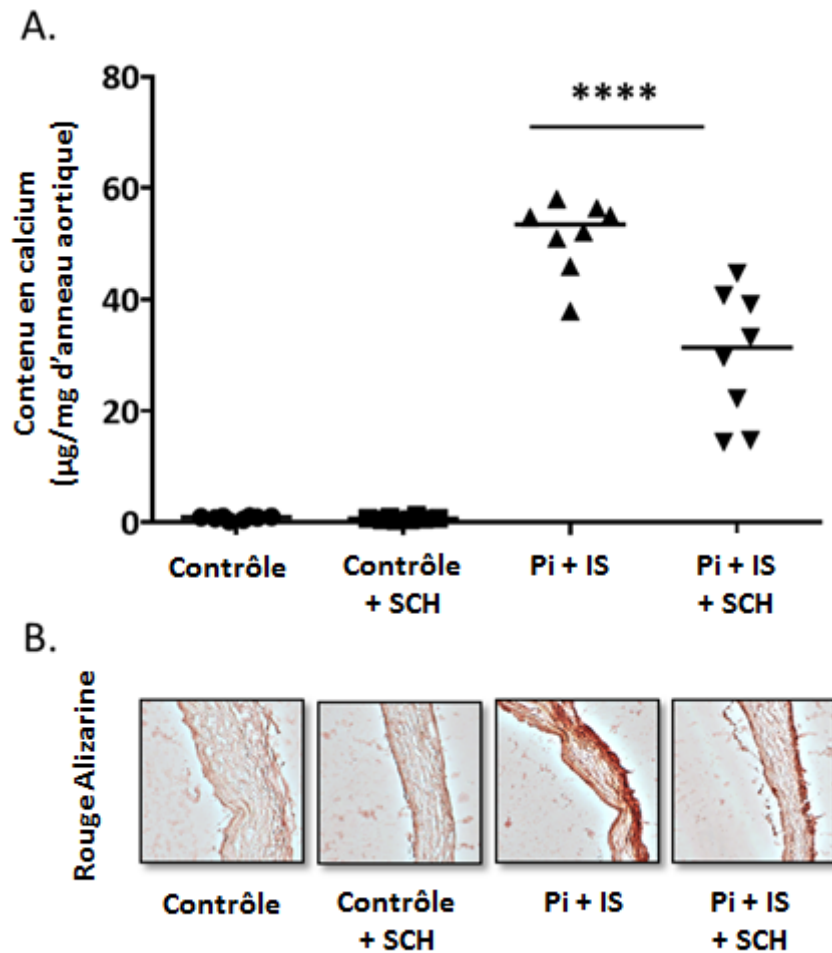


Figure 54: L'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 inhibe la calcification des anneaux aortiques de rat

A et B. Dosage du calcium tissulaire et photographie représentative d'un marquage au Rouge Alizarine des anneaux aortiques en présence de Pi+IS et de l'antagoniste de CXCR1/2, SCH527123, (SCH). n=8. ****p<0,0001 vs Pi+IS.

Il est intéressant de noter que l'expression génique de l'OPN n'a pas été modifiée par le traitement Pi+IS dans les anneaux aortiques de rat. Cependant, l'addition de SCH527123 au traitement Pi+IS induit une augmentation de $2,2 \pm 0,3$ fois du niveau d'ARNm de l'OPN par rapport au Contrôle (p < 0,0001, Figure 55).

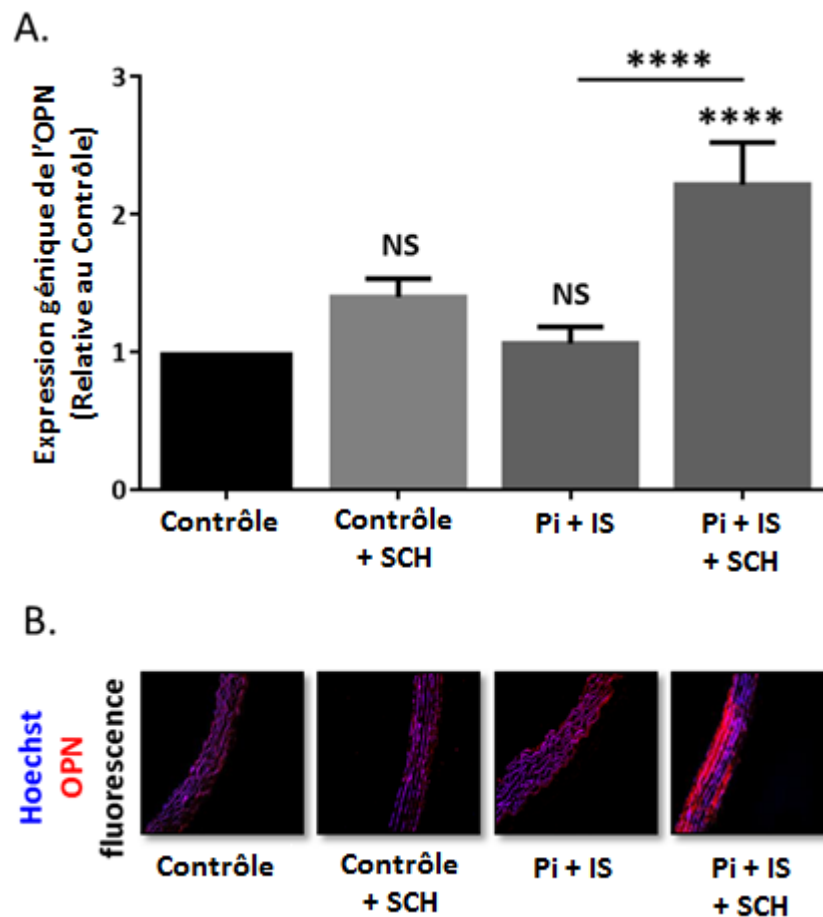


Figure 55: L'antagoniste SCH527123 des récepteurs de l'IL-8 induit l'expression de l'OPN dans les anneaux aortiques de rat en présence Pi+IS

A et B. RT-qPCR et l'immunohistochimie représentative montrant l'effet du SCH527123 sur le niveau d'ARNm de l'OPN et sur l'immunomarquage de l'OPN. $n=7$. $***p<0,001$, $****p<0,0001$ vs la condition correspondante.

Discussion

Discussion

À notre connaissance, notre étude est la première à documenter l'interaction CE-CMLV au cours de la CV induite par les toxines urémiques. Dans nos résultats préliminaires, nous avons confirmé que des concentrations urémiques de Pi induisent la calcification des CMLVH. Nous avons ensuite établi, pour la première fois, que des concentrations urémiques d'IS additionnées à Pi amplifient l'effet de ce dernier sur la calcification produite par les CMLVH alors qu'IS seul à la même concentration n'induit pas de calcification. Nous pouvons donc dire que l'IS potentialise l'effet calcifiant de Pi sur les CMLVH. Nous avons démontré aussi que l'EC-CM, recueilli à partir de CE exposées pendant 48 heures à Pi et IS, a augmenté l'effet de ces toxines urémiques sur la calcification produite par les CMLVH. Nous avons montré ensuite qu'IS et Pi+IS ont induit l'expression et la sécrétion d'IL-8 par les CE, ce qui a favorisé la calcification des CMLVH. En effet, l'inhibition du gène de l'IL-8 dans les CE en transfectant un siRNA IL-8, la neutralisation de l'IL-8 sécrétée dans l'EC-CM avec un anticorps neutralisant anti-IL-8, ou le blocage des récepteurs de l'IL-8 dans les CMLVH avec un antagoniste des récepteurs de l'IL-8 ont aboli l'effet promoteur de l'EC-CM sur la calcification produite par les CMLVH dans la condition Pi+IS. Bien que les toxines urémiques aient induit une transdifférenciation ostéogénique des CMLVH, la supplémentation en IL-8 n'a pas accentué cette transdifférenciation. Cependant, l'IL-8 a empêché l'induction de l'expression et de la sécrétion d'OPN par Pi+IS dans les CMLVH, sachant que l'OPN est un inhibiteur puissant et inductible de la calcification. De même, l'EC-CM semble avoir inhibé l'augmentation de l'expression d'OPN dans la condition Pi+IS. Cette inhibition a été levée par l'ajout d'un antagoniste des récepteurs de l'IL-8 permettant l'induction de l'OPN par Pi+IS dans les CMLVH même en présence de l'EC-CM.

En outre, en utilisant le modèle tissulaire des anneaux aortiques de rats calcifiés en présence de Pi et IS, nous avons vérifié que ces toxines urémiques augmentaient les niveaux d'ARNm de CXCL1 et CXCL2, les homologues de l'IL-8 chez le rat. De plus, nous avons démontré que le blocage des récepteurs de l'IL-8 par un antagoniste a empêché partiellement la calcification induite par Pi+IS dans les anneaux aortiques, tout en débloquent l'expression de l'OPN, comme nous l'avons observé dans le modèle cellulaire.

Rôle des toxines urémiques

Le risque élevé de maladies cardiovasculaires chez les patients atteints d'IRC ne peut pas être expliqué uniquement par les facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels²²⁵. En effet, en plus de l'âge, du sexe, du diabète, du tabagisme, de l'hypertension et d'autres facteurs de risques traditionnels, se rajoutent des facteurs non traditionnels liés à l'IRC tels que le dysfonctionnement endothélial, l'inflammation, la microalbuminurie et l'hyperphosphatémie²²⁶. La CV, aussi bien intinale que médiale, est aggravée par l'IRC et est prédictive de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaires²¹³. L'hyperphosphatémie est une inductrice puissante de la CV; et l'efficacité des chélateurs digestifs du phosphate qui forment un complexe insoluble avec le phosphate, empêchant ainsi son absorption dans le système digestif et abaissant sa concentration sérique, a été testée dans le cadre des stratégies thérapeutique de prévention de la CV chez les patients atteints d'IRC^{167,227}. Les chélateurs de phosphate peuvent contenir ou pas du calcium. Bien que les deux types de chélateurs de phosphate réussissent à contrôler la phosphatémie, ceux qui contiennent du calcium pourraient aggraver et accélérer la CV chez les patients atteints d'IRC²²⁸. Le Sévéramer est l'un des chélateurs de phosphate dépourvus de calcium le plus étudié. Le Sévéramer a en effet réduit la CV chez les patients hémodialysés²²⁹, sans toutefois réduire la mortalité toutes causes confondues dans une large étude conduite sur 2612 patients hémodyalisés²³⁰.

L'IS est une autre toxine urémique qui s'accumule dans le sang et les tissus des patients atteints d'IRC; et bien que la toxicité de l'IS sur le système cardiovasculaire et rénal soit établie, il n'existe à l'heure actuelle aucune stratégie optimale d'élimination de cette toxine urémique^{180,181}. Lors de l'IRC, les CMLV qui jouent un rôle central dans le processus de CV sont exposées à des concentrations élevées d'IS favorisant leur transdifférenciation ostéogénique, leur apoptose, la libération de vésicules matricielles et la perturbation de l'expression des inhibiteurs de la calcification²¹³. En particulier, Muteliefu *et al* ont montré *in vitro* que l'IS induit, d'une manière concentration-dépendante, la production d'ERO par les CMLVH suite à l'activation de la NADPH oxydase 4¹⁴. Ce stress oxydatif a été associé à la prolifération cellulaire et à une augmentation de l'expression des marqueurs d'ostéoblastes ALP, RUNX-2 et OPN^{14,224}. L'IS a également favorisé la sénescence des CMLVH en stimulant l'activité de la β -galactosidase, l'expression de p53 par les ERO, ainsi que l'expression de la Prélamine A, trois marqueurs de la sénescence cellulaire²¹⁴. En outre, chez des rats hypertendus, l'IS a engendré la calcification aortique et l'épaississement de la paroi des aortes arquées, thoraciques et abdominales avec une co-localisation des marqueurs ostéogéniques (l'OPN, la RUNX2 et l'ALP)²¹⁵, l'IS a aussi induit la sénescence aortique et l'accumulation de Prélamine A dans les cellules intégrées dans les zones calcifiées aortiques^{214,231}. Il a été proposé que la sénescence des CMLV modifie leur phénotype sécrétoire qui se manifeste par une surexpression des marqueurs ostéogéniques et une perte des inhibiteurs de la calcification (tels que la MGP) indiquant ainsi une transdifférenciation ostéogénique des CMLV et une participation aux maladies cardiovasculaires par induction de la CV²³². Cependant, très peu d'études ont démontré l'effet de l'IS sur la calcification produite par les CMLV. Wu *et al* ont montré que les CML de la veine ombilicale humaine calcifient en présence de 500 μ M d'IS après 14 jours de traitement, alors que Chen *et al* et Zhang *et al* ont induit une calcification des CMLVH en culture suite à une exposition à une concentration très élevée d'IS (1000 μ M) pour

une durée de 6 et 7 jours, respectivement²¹⁶⁻²¹⁸. Dans notre étude, le traitement par IS seul, pendant 14 jours, à une concentration proche de celle mesurée dans les séra de patients dialysés (200µM) n'a pas induit de calcification des CMLVH en culture. Toutefois, la concentration de 200µM d'IS a augmenté significativement la calcification des CMLVH induite par des concentrations élevées de Pi (3mM). Au niveau tissulaire, la concentration urémique de l'IS a également favorisé de manière significative l'effet procalcifiant de Pi dans les anneaux aortiques de rat alors qu'aucun effet n'a été observé avec l'IS seul. Ces résultats suggèrent que l'IS pourrait agir non seulement comme un facteur procalcifiant direct à des concentrations élevées mais aussi, à des concentrations moins élevées, comme un facteur de potentialisation chronique d'un inducteur fort et bien établi de la CV, comme l'hyperphosphatémie. Le mécanisme par lequel IS amplifie l'effet procalcifiant du Pi peut dépendre de l'activation de la voie JNK qui stimule l'expression de Pit-1 comme cela a été démontré dans les CML de la veine ombilicale humaine exposées à 500µM d'IS²¹⁷. En effet, le transport du phosphate par Pit-1, qui appartient au type III des co-transporteurs de phosphate dépendant du sodium, est essentiel pour la calcification des CMLV *in vitro* et pour la transdifférenciation ostéogénique¹⁷⁴. Bien que l'IS soit une toxine urémique fortement liée à l'albumine, l'effet promoteur significatif de l'IS sur la calcification *in vitro* des CMLVH induite par Pi n'a pas été modifié en présence de 4% d'albumine. Des études précédentes ont montré que, même en présence d'albumine, 100µM d'IS ont été capables de stimuler significativement l'expression du Facteur Tissulaire impliqué dans une variété de maladies cardiovasculaires (athérosclérose, hyperplasie néointimale, anomalies de la coagulation entre autres) dans les CMLV²³³, tandis que 250µM d'IS a favorisé significativement la prolifération des CMLV de rat. Cette dernière a été inhibée par le probénécide, un inhibiteur des transporteurs des anions organiques (OAT)²³⁴. Les effets toxiques de l'IS peuvent donc dépendre de l'absorption cellulaire active de l'IS par les

transporteurs, plutôt que d'une diffusion hypothétique passive de la forme libre de l'IS à travers la membrane cellulaire²³⁵.

Rôle des cellules endothéliales

Puisque l'endothélium est directement exposé aux toxines urémiques circulantes dans le sang, nous avons émis l'hypothèse que les CE pourraient participer à l'effet promoteur de l'IS sur la CV. Nous avons d'abord observé que l'EC-CM a exacerbé significativement les effets de Pi et de Pi+IS sur la calcification produite par les CMLVH. L'EC-CM en condition contrôle (sans toxine urémique) ainsi que le milieu basal pour la culture des CE (l'EBM-2) exempt de conditionnement cellulaire n'ont pas modifié la calcification des CMLVH induite par Pi+IS. De ce fait, nous en avons déduit que les CE exposées aux toxines urémiques ont pu sécréter des facteurs, présents dans l'EC-CM, qui ont aggravé la calcification des CMLVH.

Ensuite, nous avons utilisé un cytokine array permettant le criblage et la quantification de 40 facteurs impliqués dans le métabolisme osseux. Cette recherche sans a priori a permis l'identification de l'IL-8 comme un facteur contenu dans l'EC-CM et dont la concentration est significativement induite suite à l'exposition des CE à Pi+IS. Ce résultat a été confirmé par l'ELISA indiquant que la libération de l'IL-8 est dépendante de la concentration d'IS, et par la RT-qPCR montrant la stimulation de l'expression du gène de l'IL-8 dans les CE par l'IS. Là aussi, l'albumine n'a pas empêché de manière significative l'effet de l'IS sur la libération d'IL-8 par les CE, ce qui est cohérent avec les travaux précédents ne montrant pas d'effet limitant de l'albumine sur la libération du facteur tissulaire, la prolifération et le stress oxydatif des CE exposées à IS^{16,17}.

En outre, le Pi seul, jusqu'à une concentration de 5 mM, n'a pas induit la sécrétion de l'IL-8 par les CE. Cependant, 3mM de Pi a significativement amplifié la stimulation de l'IL-8 par l'IS. Dans une étude récente sur des CE immortalisées, 2,5mM de Pi a induit une sécrétion de microparticules à activité procoagulante ce qui est conforme avec le lien pathologique entre l'hyperphosphatémie et le dysfonctionnement endothélial²³⁶. De même, des concentrations élevées de Pi (2,5 et 5mM) ont gravement altéré les fonctions des CE immortalisées telles que l'angiogenèse, la formation et la morphologie de la paroi vasculaire, la migration et la survie des CE²³⁷. En effet, la sénescence des CE est aggravée par des niveaux élevés de Pi qui agissent à travers la stimulation de la production de l'ET1 qui induit l'activité de la β -galactosidase et l'expression de p16 liées à la senescence cellulaire²³⁸. En outre, la sécrétion d'IL-8 par les CE a été rapportée lors des infections bactériennes à travers la voie de signalisation des « Toll-like receptor » 2 et 4^{239,240}; et en réponse à l'oxLDL, à l'homocystéine ou au TNF α ²⁴¹. L'exposition des CE au plasma ou sérum humain urémique a également entraîné une augmentation de l'expression de l'IL-8 en fonction du temps et du stade de l'IRC^{242,243}. Cependant, aucun travail n'a été publié à ce jour montrant un effet inducteur de l'IS sur la libération de l'IL-8 par les CE. Le mécanisme par lequel l'IS et l'association Pi+IS agissent sur les CE pour induire l'expression et la sécrétion de l'IL-8 mériterait donc une étude plus approfondie. De façon intéressante, dans notre modèle d'anneaux aortiques de rat, le Pi+IS a également induit, d'une façon significative, l'expression des gènes de CXCL1 et CXCL2, cytokines homologues de l'IL-8 humaine chez le rat.

Ensuite, nous avons vérifié si l'IL-8 pouvait expliquer l'effet promoteur de l'EC-CM sur la calcification induite par Pi+IS dans les CMLVH. En premier lieu, l'IL-8 a stimulé d'une manière concentration-dépendante les calcifications induites par Pi+IS dans les CMLVH en culture. De plus, l'anticorps neutralisant l'IL-8 ou l'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 ont significativement empêché l'effet procalcifiant de l'EC-CM dans la condition Pi+IS. De même, l'EC-CM, collecté à partir des CE dont le gène de l'IL-8 a été éteint, a aussi aboli l'effet procalcifiant de l'EC-CM dans la condition Pi+IS. Ces résultats mettent en évidence le rôle potentiel et important de l'IL-8 dans la CV comme conséquence du dialogue CE-CMLV lors de l'IRC. Or l'IL-8 est connu pour jouer un rôle important dans la pathogenèse de l'athérosclérose²⁴¹, qui est accélérée dans l'IRC²⁴⁴. Une étude clinique prospective incluant 103 patients atteints d'IRC aux stades 3 ou 4 a indiqué qu'une concentration sérique élevée en IL-8 est corrélée à l'étendue des calcifications des artères coronaires et abdominales²⁴⁵. De plus, un effet délétère des interactions CE-CMLV sur la CV a été précédemment supposé pour de nombreuses raisons. Tout d'abord, la calcification *in vitro* induite par la BMP4 des CMLV isolées des souris est aggravée par la présence de VEGF⁷¹. De plus, le NO inhibe la calcification et la transdifférenciation ostéogénique des CMLV par la voie de la GMPc en atténuant l'activité du TGFβ mesurée par la phosphorylation du complexe smad2/3 et en réprimant l'expression des marqueurs ostéogéniques tels que l'ALP, l'ostéocalcine et le collagène de type 1 chez des CMLV isolées de l'aorte thoracique des souris⁶⁷. En outre, plusieurs facteurs endothéliaux tels que le VEGF et l'angiopoïétine sont impliqués dans la formation osseuse. Récemment, RANKL a augmenté la libération de BMP2 par les CE aortiques humaines; et la culture des CMLVH aortiques dans un milieu conditionné par les CE exposées au RANKL a stimulé l'expression et l'activité de l'ALP et l'expression de RUNX2, deux marqueurs ostéogéniques bien établis, chez les CMLVH⁷⁰. Dans notre travail, RANKL ainsi que PDGFB et TGFβ qui sont également impliqués dans le dialogue entre CE et CMLV⁶, ont présenté des concentrations inférieures à

la limite de quantification du cytokine array que nous avons effectué sur l'EC-CM, suggérant qu'il n'ont probablement pas contribué dans notre modèle à l'effet procalcifiant de l'EC-CM. Outre l'IL-8, la concentration de l'ICAM-1 soluble a été aussi significativement augmentée dans la condition Pi+IS, mais l'ajout d'ICAM-1 soluble n'a pas eu d'effet supplémentaire sur les calcifications produites par les CMLVH dans la condition Pi+IS (Figure 57) contrairement à l'effet observé avec l'IL-8.

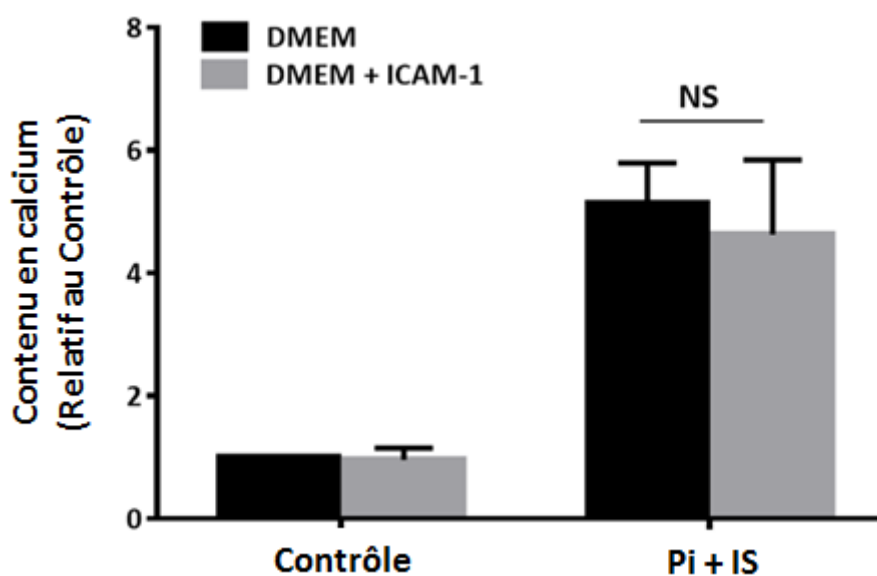


Figure 56: L'ICAM-1 n'accroît pas l'effet de Pi+IS sur la calcification des CMLVH

La quantification du Rouge Alizarine après 14 jours de traitement des CMLVH en présence de Pi+IS supplémenté ou non en ICAM-1 ne montrant aucune variation de la calcification des CMLVH en condition correspondante non supplémentée. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM. $n=3$.

Effet de l'IL-8 sur le changement phénotypique des CMLVH

La CV résulte en partie de la capacité des CMLV à se transdifférencier en cellules ostéogéniques²¹³. Dans notre étude, Pi+IS a significativement augmenté l'expression des marqueurs ostéogéniques RUNX2, BMP2 et ALP et diminué l'expression des marqueurs contractiles SM22 α , SMMHC et α SMA dans les CMLVH. Ces effets n'ont pas été amplifiés par l'IL-8, ce qui suggère que l'effet promoteur de l'IL-8 sur la calcification induite par Pi+IS pourrait ne pas être dû à une amplification de la transdifférenciation ostéogénique des CMLVH. Cependant, Pi+IS a également induit l'expression de l'OPN, qui a été abrogée par l'IL-8. Ainsi, l'augmentation de l'expression d'inducteurs des calcifications (BMP2, ALP) sous l'effet de Pi+IS pourrait être associée à une réduction de l'expression d'un inhibiteur de calcification (OPN) lorsque l'on rajoute l'IL-8. De manière intéressante, l'EC-CM a également empêché l'induction de l'OPN dans les CMLVH exposées au Pi+IS alors que l'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 ajouté à l'EC-CM a débloqué l'induction de l'OPN dans les CMLVH exposées au Pi+IS.

L'OPN est une phosphoprotéine dont la localisation est normalement restreinte à la matrice et la morphogenèse osseuses; cependant, elle est également rencontrée dans les plaques d'athérosclérose alors qu'elle est absente dans les artères saines²⁴⁶. L'OPN empêche les dépôts ectopiques de calcium et est un inhibiteur puissant et inductible des calcifications vasculaires²⁴⁶. Bien que la déficience en OPN n'ait pas conduit à la calcification spontanée de la matrice des CMLV dans des conditions de culture normales, elle a significativement augmenté la calcification de la matrice extracellulaire dans un environnement riche en phosphate et ceci de manière dépendante du temps et de la concentration, suggérant un mécanisme adaptatif des CMLV face à une exposition à des niveaux élevés de phosphate^{140,247}.

L'hyperphosphatémie et le sérum urémique induisent l'expression de l'OPN dans les CMLV^{141,144}. Chez les patients hémodialysés, les taux plasmatiques de l'OPN ont été significativement plus élevés par rapport aux sujets sains et ont été corrélés avec l'indice de calcification aortique¹⁴³. Il a été suggéré qu'un niveau élevé d'OPN pourrait être une réponse protectrice contre l'augmentation de la calcification lors de l'IRC, limitant ainsi son étendue. Cependant, l'augmentation de l'expression de l'OPN pourrait ne pas être suffisante pour empêcher la progression de la calcification, en particulier en cas de déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-calcifiants¹⁴⁵. En effet, nos résultats supportent le concept selon lequel une augmentation de l'expression de l'OPN est associée à la CV du fait de la transdifférenciation ostéogénique des CMLV, et la CV est aggravée en absence de l'OPN. Ainsi, une augmentation de l'expression de l'OPN dans les cellules médiales aortiques a été rapportée chez des souris nourries avec un régime riche en phosphate en réponse à un traitement avec un agoniste du récepteur de la vitamine D et cette augmentation de l'expression de l'OPN a été associée à une prévention significative de la calcification aortique²⁴⁸. Dans notre modèle cellulaire, nous avons observé que la supplémentation en OPN dans le milieu basal des CMLVH ou dans le milieu des CMLVH traités avec l'EC-CM a fortement empêché la calcification dans la condition Pi+IS. En bloquant les récepteurs de l'IL-8 avec le SCH527123, l'effet inhibiteur d'EC-CM sur l'expression et la sécrétion de l'OPN par les CMLVH a été levé. Au niveau tissulaire, le SCH527123 a partiellement empêché la calcification induite par Pi+IS des anneaux aortiques du rat et cet effet a été associé à une induction significative de l'expression d'OPN. Le SCH527123 est un antagoniste allostérique spécifique et puissant de CXCR1 et CXCR2 avec une haute affinité pour CXCR2^{222,249,250}. Il a été étudié chez les rongeurs, les porcs, les singes et les humains où il a démontré une puissante capacité à inhiber la mobilisation des neutrophiles induite par le CXCL1 et l'IL-8, au cours de l'inflammation pulmonaire chronique^{222,251,252}. Cependant, il n'a pas encore été testé dans le blocage de la CV induite par l'IL-8.

Ainsi, les CE exposées à Pi+IS sécrètent de l'IL-8 qui aggrave l'effet de ces toxines urémiques sur les calcifications produites par les CMLV. L'IL-8 semble jouer un rôle critique dans les CV en inhibant l'induction de l'OPN par les toxines urémiques chez les CMLV, créant probablement un déséquilibre entre les inducteurs et les inhibiteurs de la CV (Figure 58).

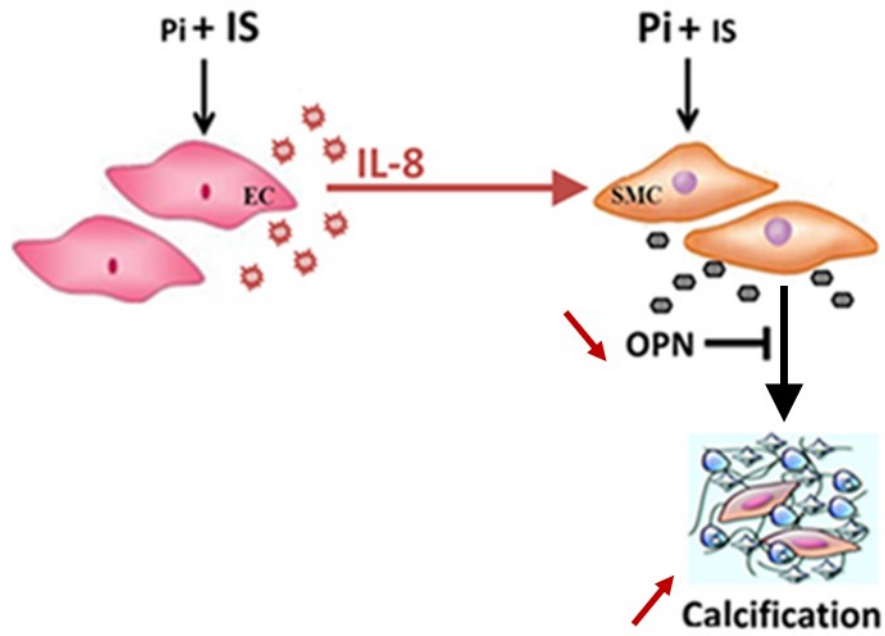


Figure 57: Effet proposé des CE exposées à Pi+IS sur la calcification produite par les CMLV

L'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 bloque l'effet promoteur de l'IL-8 sur la CV en levant l'inhibition exercée par le milieu conditionné sur la synthèse de l'OPN chez les CMLV dans les conditions urémiques, d'où le potentiel thérapeutique de cette approche dans la prévention des complications cardiovasculaires lors de l'IRC (Figure 59).

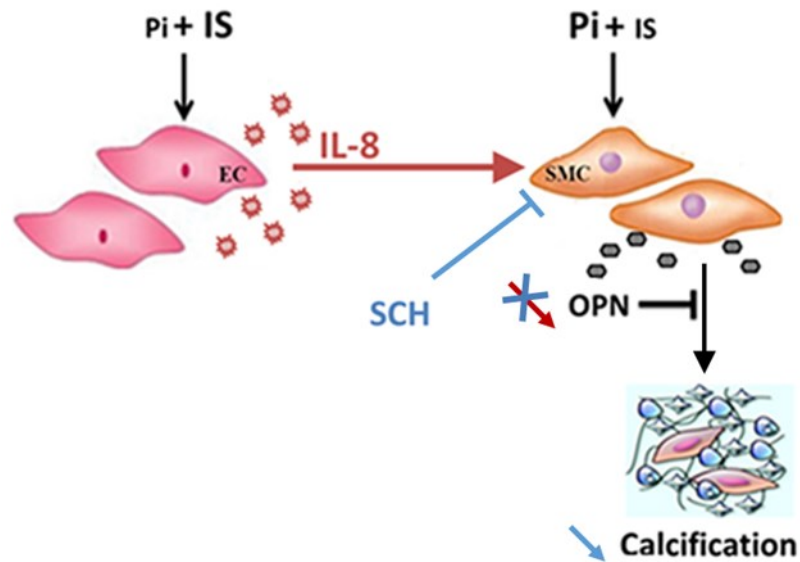


Figure 58: Effet protecteur proposé de l'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 (SCH) contre la calcification produite par les CMLV

Conclusion

Lors de l'IRC, la CV est favorisée par des facteurs urémiques tels que l'hyperphosphatémie et l'accumulation de l'IS qui possèdent des effets délétères sur les CE et les CMLV. Or le dialogue CE-CMLV est essentiel pour la formation et le bon fonctionnement des vaisseaux sanguins, et est impliqué dans le développement de nombreuses pathologies cardiovasculaires.

Ici, nous avons confirmé dans la culture des CMLV et dans le modèle tissulaire des anneaux aortiques de rats qu'une concentration élevée en Pi induit une calcification et que cet effet est favorisé par IS. Mais, nous avons également montré pour la première fois que les CE exposées à Pi+IS sécrètent l'IL-8 qui aggrave significativement ce processus de calcification des CMLV. Bien que l'IL-8 n'accentue pas la transdifférenciation des CMLV induite par les toxines urémiques, cette IL-8 empêche la synthèse de l'OPN par les CMLV; entraînant ainsi un déséquilibre défavorable entre les inducteurs et les inhibiteurs de la CV. L'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 soulage l'inhibition exercée par le milieu conditionné sur la synthèse de l'OPN par les CMLV dans la condition urémique. En outre, en utilisant le modèle tissulaire des anneaux aortiques de rats, nous avons observé que les toxines induisent l'expression des homologues de l'IL-8 chez le rat et que l'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 prévient partiellement la calcification induite par Pi+IS, tout en débloquent l'expression de l'OPN.

Notre travail suggère un nouveau rôle de l'IL-8 en tant que médiateur du dialogue CE-CMLV favorisant la CV en présence des inducteurs de la calcification, tel que le Pi et l'IS. De plus, l'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 bloque l'effet promoteur de l'IL-8 sur la CV d'où le potentiel thérapeutique de cette approche dans la prévention des complications cardiovasculaires lors de l'IRC.

Limites et Perspectives

Limites et Perspectives

In vitro

➤ Au niveau cellulaire

- ❖ Dans notre travail, nous avons démontré que les HUVEC exposées à Pi+IS sécrètent l'IL-8 qui aggrave la calcification produite par les CMLV. Or les CMLV que nous utilisons sont issues de l'aorte humaine, et bien que la toxicité de l'IS soit bien établie dans les HUVEC et que ce type cellulaire soit validé comme modèle de cellules endothéliales matures^{16,19,20,195,210}, il serait pertinent de vérifier l'expression et la sécrétion d'IL-8, dans les cellules endothéliales artérielles humaines (notamment aortiques) exposées à Pi+IS.
- ❖ Bien que nous ayons démontré que l'IS induit la sécrétion d'IL-8 par les HUVEC d'une manière concentration-dépendante, nous n'avons pas exploré les mécanismes de cette induction. La voie de l'AhR pourrait être importante à explorer. En effet, l'IS est connu pour induire la sécrétion d'IL-6 par les CE via l'absorption médiée par les transporteurs des anions organiques²¹⁰ et l'activation de l'AhR par l'IS induit la sénescence des HUVEC²⁰⁸.

- ❖ De plus, il serait intéressant d'évaluer l'effet du sérum des patients atteints d'IRC sur les CE, et particulièrement, sur l'induction de l'IL-8. Les effets de l'IL-8 pourraient en effet être modulés (positivement ou négativement) par la présence d'autres facteurs accumulés dans le sérum des patients atteints d'IRC.
- ❖ Au niveau des CMLV, nous avons utilisé des cellules isolées à partir d'aortes ascendantes proximales humaines, obtenues après pontage aortique de patients atteints de diverses maladies cardiovasculaires. Ce serait intéressant de séparer les CMLV en deux groupes, celles issues des patients atteints d'IRC ou non, et d'évaluer la calcification. Il serait possible que les CML aortiques isolées de patients présentant déjà une maladie urémique seraient « sensibilisées » à l'IL-8.
- ❖ Comme nous avons établi que l'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 bloque l'effet promoteur de l'EC-CM sur la calcification produite par les CMLV, il sera d'une grande importance d'évaluer son effet sur les CMLV traitées par le sérum des patients atteints d'IRC.
- ❖ Dans notre travail, nous avons prouvé que l'IL-8 empêche la synthèse de l'OPN par les CMLV, la prochaine étape sera d'explorer les mécanismes moléculaires et cellulaires qui pourraient expliquer cette inhibition.

➤ **Au niveau tissulaire**

- ❖ Pi et IS ont stimulé l'expression des 2 homologues de l'IL-8 humaine chez le rat : CXCL-1 et CXCL-2. Cette expression a été associée à une augmentation significative de la calcification des anneaux aortiques. De plus, l'antagoniste des récepteurs CXCR-1 et CXCR-2, dont CXCL-1 et CXCL-2 sont les ligands

endogènes, a inhibé la calcification des anneaux aortiques tout en bloquant l'expression de l'OPN. Les résultats actuels ne permettent pas de distinguer les effets propres à CXCL-1 et CXCL-2 d'une part et la participation de CXCR-1 et CXCR-2 d'autre part. De plus, l'action de l'antagoniste n'est pas limitée seulement aux homologues de l'IL-8 d'origine endothéliale. Il serait pertinent de transfecter sélectivement les CE des anneaux aortiques de rats par un siRNA CXCL-1 ou CXCL-2 ou les CML aortiques par un siRNA CXCR-1 ou CXCR-2 et de vérifier nos résultats sur la calcification et l'expression de l'OPN. D'ailleurs, des outils de transfection ciblée des CE à base du lentivirus ont été déjà développés^{253,254}. Ces travaux permettraient d'explorer le dialogue CE-CML à l'échelle tissulaire.

In vivo

➤ Modèle animal

- ❖ Comme nos résultats in vitro sont prometteurs, que ce soit dans notre modèle cellulaire ou tissulaire, la prochaine étape serait d'utiliser un modèle d'IRC chez la souris pour évaluer l'effet de l'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 sur la CV et sur l'expression de l'OPN dans les artères; pour effectuer des dosages sériques de l'IL-8, de l'IS et d'autres toxines urémiques; et vérifier la corrélation entre les taux sériques de l'IL-8 et de l'IS.
- ❖ En outre, il serait intéressant d'induire une IRC chez un modèle de souris transgénique n'exprimant pas l'IL-8 et d'évaluer son effet sur la CV.

➤ **Chez l'homme**

- ❖ Une étude clinique sur une cohorte de patients atteints d'IRC apportera de la clarté sur la corrélation entre le stade de l'IRC et la concentration sérique d'IL-8; la corrélation entre les concentrations sériques d'IL-8 et des toxines urémiques, notamment l'IS; et sur l'intérêt thérapeutique de l'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 sur la CV et sur les évènements cardiovasculaires.

Bibliographie

1. Salisbury E, Hipp J, Olmsted-Davis EA, Davis AR, Heggeness MH, Gannon FH. Histologic identification of brown adipose and peripheral nerve involvement in human atherosclerotic vessels. *Hum Pathol.* 2012;43(12):2213-2222. doi:10.1016/j.humpath.2012.03.013.
2. Senger DR, Davis GE. Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(8):a005090. doi:10.1101/cshperspect.a005090.
3. Triggie CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012;90(6):713-738. doi:10.1139/y2012-073.
4. Dora KA. Cell-cell communication in the vessel wall. *Vasc Med Lond Engl.* 2001;6(1):43-50.
5. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(5):630-638. doi:10.1161/ATVBAHA.107.161521.
6. Lilly B. We have contact: endothelial cell-smooth muscle cell interactions. *Physiol Bethesda Md.* 2014;29(4):234-241. doi:10.1152/physiol.00047.2013.
7. Allison MA, Criqui MH, Wright CM. Patterns and Risk Factors for Systemic Calcified Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(2):331-336. doi:10.1161/01.ATV.0000110786.02097.0c.
8. Keelan PC, Bielak LF, Ashai K, Jamjoum LS, Denktas AE, Rumberger JA, Sheedy II PF, Peyser PA, Schwartz RS. Long-term prognostic value of coronary calcification detected by electron-beam computed tomography in patients undergoing coronary angiography. *Circulation.* 2001;104(4):412-417.
9. Vliegenthart R. Coronary Calcification Improves Cardiovascular Risk Prediction in the Elderly. *Circulation.* 2005;112(4):572-577. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.488916.
10. Rennenberg RJMW, Kessels AGH, Schurgers LJ, van Engelshoven JMA, de Leeuw PW, Kroon AA. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis. *Vasc Health Risk Manag.* 2009;5(1):185-197.
11. Liberman M, Pesaro AEP, Carmo LS, Serrano CV. Vascular calcification: pathophysiology and clinical implications. *Einstein Sao Paulo Braz.* 2013;11(3):376-382.
12. Shao J-S, Cheng S-L, Sadhu J, Towler DA. Inflammation and the Osteogenic Regulation of Vascular Calcification: A Review and Perspective. *Hypertension.* 2010;55(3):579-592. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134205.
13. Covic A, Vervloet M, Massy ZA, Torres PU, Goldsmith D, Brandenburg V, Mazzaferro S, Evenepoel P, Bover J, Apetrii M, Cozzolino M. Bone and mineral disorders in chronic kidney disease: implications for cardiovascular health and ageing in the general population. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(4):319-331. doi:10.1016/S2213-8587(17)30310-8.
14. Muteliefu G, Enomoto A, Jiang P, Takahashi M, Niwa T. Indoxyl sulphate induces oxidative stress and the expression of osteoblast-specific proteins in vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(7):2051-2058. doi:10.1093/ndt/gfn757.

15. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Wolisi GO, Koczman JJ, LaClair R, Moe SM. The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* 2006;70(6):1046-1053. doi:10.1038/sj.ki.5001663.
16. Dou L, Bertrand E, Cerini C, Faure V, Sampol J, Vanholder R, Berland Y, Brunet P. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int.* 2004;65(2):442-451. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00399.x.
17. Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V, Cerini C, Berland Y, Dignat-George F, Brunet P. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J Thromb Haemost.* 2007;5(6):1302-1308. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02540.x.
18. Tumor Z, Niwa T. Indoxyl sulfate inhibits nitric oxide production and cell viability by inducing oxidative stress in vascular endothelial cells. *Am J Nephrol.* 2009;29(6):551-557. doi:10.1159/000191468.
19. Shen W-C, Liang C-J, Huang T-M, Liu C-W, Wang S-H, Young G-H, Tsai J-S, Tseng Y-C, Peng Y-S, Wu V-C, Chen Y-L. Indoxyl sulfate enhances IL-1 β -induced E-selectin expression in endothelial cells in acute kidney injury by the ROS/MAPKs/NF κ B/AP-1 pathway. *Arch Toxicol.* 2016;90(11):2779-2792. doi:10.1007/s00204-015-1652-0.
20. Ito S, Osaka M, Higuchi Y, Nishijima F, Ishii H, Yoshida M. Indoxyl Sulfate Induces Leukocyte-Endothelial Interactions through Up-regulation of E-selectin. *J Biol Chem.* 2010;285(50):38869-38875. doi:10.1074/jbc.M110.166686.
21. Watanabe I, Tatebe J, Namba S, Koizumi M, Yamazaki J, Morita T. Activation of aryl hydrocarbon receptor mediates indoxyl sulfate-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2013;77(1):224-230.
22. Block GA, Port FK. Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: recommendations for a change in management. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2000;35(6):1226-1237.
23. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2000;87(7):E10-17.
24. Günthner T, Jankowski V, Kretschmer A, Nierhaus M, van der Giet M, Zidek W, Jankowski J. Endothelium and Vascular Smooth Muscle Cells in the Context of Uremia. *Semin Dial.* 2009;22(4):428-432. doi:10.1111/j.1525-139X.2009.00594.x.
25. Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci Int J Physiol Prod Jointly Int Union Physiol Sci Am Physiol Soc.* 2002;17:105-109.
26. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008;22(10):1276-1312. doi:10.1101/gad.1653708.
27. Jiang B, M. E. Formation of Stable Vascular Networks in Engineered Tissues. In: Eberli D, ed. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials.* InTech; 2011. doi:10.5772/23223.

28. Donovan J, Abraham D, Norman J. Platelet-derived growth factor signaling in mesenchymal cells. *Front Biosci Landmark Ed.* 2013;18:106-119.
29. Boucher P, Li W-P, Matz RL, Takayama Y, Auwerx J, Anderson RGW, Herz J. LRP1 functions as an atheroprotective integrator of TGFbeta and PDGF signals in the vascular wall: implications for Marfan syndrome. *PLoS One.* 2007;2(5):e448. doi:10.1371/journal.pone.0000448.
30. Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol.* 1998;141(3):805-814.
31. Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J, Schepke L, Stockmann C, Johnson RS, Angle N, Cheresch DA. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature.* 2008;456(7223):809-813. doi:10.1038/nature07424.
32. Brudno Y, Ennett-Shepard AB, Chen RR, Aizenberg M, Mooney DJ. Enhancing microvascular formation and vessel maturation through temporal control over multiple pro-angiogenic and pro-maturation factors. *Biomaterials.* 2013;34(36):9201-9209. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.08.007.
33. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature.* 1995;376(6535):70-74. doi:10.1038/376070a0.
34. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis. *Cell.* 1996;87(7):1171-1180. doi:10.1016/S0092-8674(00)81813-9.
35. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997;277(5322):55-60.
36. Pellegrin M, Mazzolai L, Berthelot A, Laurant P. Dysfonction endothéliale et risque cardiovasculaire. L'exercice protège la fonction endothéliale et prévient la maladie cardiovasculaire. *Sci Sports.* 2009;24(2):63-73. doi:10.1016/j.scispo.2008.10.003.
37. Maejima D, Kawai Y, Ajima K, Ohhashi T. Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB produces NO-mediated relaxation and PDGF receptor β -dependent tonic contraction in murine iliac lymph vessels. *Microcirc N Y N 1994.* 2011;18(6):474-486. doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00108.x.
38. Gao J, Bellien J, Gomez E, Henry J-P, Dautreux B, Bounoure F, Skiba M, Thuillez C, Richard V. Soluble epoxide hydrolase inhibition prevents coronary endothelial dysfunction in mice with renovascular hypertension: *J Hypertens.* 2011;29(6):1128-1135. doi:10.1097/HJH.0b013e328345ef7b.
39. Majed BH, Khalil RA. Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. *Pharmacol Rev.* 2012;64(3):540-582. doi:10.1124/pr.111.004770.

40. Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, James MJ. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001;167(5):2831-2838.
41. Liu H, Kennard S, Lilly B. NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires endothelial-expressed JAGGED1. *Circ Res*. 2009;104(4):466-475. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.184846.
42. High FA, Lu MM, Pear WS, Loomes KM, Kaestner KH, Epstein JA. Endothelial expression of the Notch ligand Jagged1 is required for vascular smooth muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(6):1955-1959. doi:10.1073/pnas.0709663105.
43. Boucher J, Gridley T, Liaw L. Molecular pathways of notch signaling in vascular smooth muscle cells. *Front Physiol*. 2012;3:81. doi:10.3389/fphys.2012.00081.
44. Haddock RE, Grayson TH, Brackenbury TD, Meaney KR, Neylon CB, Sandow SL, Hill CE. Endothelial coordination of cerebral vasomotion via myoendothelial gap junctions containing connexins 37 and 40. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2006;291(5):H2047-H2056. doi:10.1152/ajpheart.00484.2006.
45. Isakson BE, Damon DN, Day KH, Liao Y, Duling BR. Connexin40 and connexin43 in mouse aortic endothelium: evidence for coordinated regulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(3):H1199-1205. doi:10.1152/ajpheart.00945.2005.
46. Rickenbacher P. Update Arterielle Hypertonie 2015: Update Arterial Hypertension 2015. *PRAXIS*. 2015;104(9):461-465. doi:10.1024/1661-8157/a001991.
47. Kallikazaros IE. Arterial hypertension. *Hell J Cardiol HJC Hell Kardiologike Epitheorese*. 2013;54(5):413-415.
48. Gao Y, Chen T, Raj JU. Endothelial and Smooth Muscle Cell Interactions in the Pathobiology of Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54(4):451-460. doi:10.1165/rcmb.2015-0323TR.
49. Vanhoutte P. Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst*. 2000;81(1-3):271-277. doi:10.1016/S0165-1838(00)00126-0.
50. Gao Y, Portugal AD, Negash S, Zhou W, Longo LD, Usha Raj J. Role of Rho kinases in PKG-mediated relaxation of pulmonary arteries of fetal lambs exposed to chronic high altitude hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(3):L678-684. doi:10.1152/ajplung.00178.2006.
51. Chester AH, Yacoub MH. The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2014;2014(2):62-78. doi:10.5339/gcsp.2014.29.
52. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1995;333(4):214-221. doi:10.1056/NEJM199507273330403.
53. Sandow SL, Bramich NJ, Bandi HP, Rummery NM, Hill CE. Structure, function, and endothelium-derived hyperpolarizing factor in the caudal artery of the SHR and WKY rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(5):822-828. doi:10.1161/01.ATV.0000067425.06019.D7.

54. Tang EHC, Vanhoutte PM. Gap Junction Inhibitors Reduce Endothelium-Dependent Contractions in the Aorta of Spontaneously Hypertensive Rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;327(1):148-153. doi:10.1124/jpet.108.140046.
55. MacLean M (Mandy) R. The serotonin hypothesis in pulmonary hypertension revisited: targets for novel therapies (2017 Grover Conference Series). *Pulm Circ*. 2018;8(2):204589401875912. doi:10.1177/2045894018759125.
56. Gairhe S, Bauer NN, Gebb SA, McMurtry IF. Serotonin passes through myoendothelial gap junctions to promote pulmonary arterial smooth muscle cell differentiation. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303(9):L767-L777. doi:10.1152/ajplung.00183.2012.
57. Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur A-M, Dewachter L, Fadel E, Dartevielle P, Humbert M, Simonneau G, Hanoun N, Saurini F, Hamon M, Adnot S. Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation*. 2006;113(15):1857-1864. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.591321.
58. Hervé P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubeau P, Cerrina J, Duroux P, Drouet L. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med*. 1995;99(3):249-254.
59. Upton PD, Morrell NW. The transforming growth factor- β -bone morphogenetic protein type signalling pathway in pulmonary vascular homeostasis and disease: Signalling pathways in pulmonary vasculature. *Exp Physiol*. 2013;98(8):1262-1266. doi:10.1113/expphysiol.2012.069104.
60. Liu JQ, Folz RJ. Extracellular superoxide enhances 5-HT-induced murine pulmonary artery vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(1):L111-118. doi:10.1152/ajplung.00006.2004.
61. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and High-Risk Plaque. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(6):937-954. doi:10.1016/j.jacc.2005.03.074.
62. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-126. doi:10.1056/NEJM199901143400207.
63. Wang T, Palucci D, Law K, Yanagawa B, Yam J, Butany J. Atherosclerosis: pathogenesis and pathology. *Diagn Histopathol*. 2012;18(11):461-467. doi:10.1016/j.mpdhp.2012.09.004.
64. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317-325. doi:10.1038/nature10146.
65. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-241. doi:10.1038/35025203.
66. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(11):2292-2301. doi:10.1161/ATVBAHA.107.149179.
67. Kanno Y, Into T, Lowenstein CJ, Matsushita K. Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- β signalling. *Cardiovasc Res*. 2008;77(1):221-230. doi:10.1093/cvr/cvm049.

68. Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, Ingram RT. Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1994;94(4):1597-1604. doi:10.1172/JCI117501.
69. Singh DK, Winocour P, Farrington K. Review: Endothelial cell dysfunction, medial arterial calcification and osteoprotegerin in diabetes. *Br J Diabetes Vasc Dis*. 2010;10(2):71-77. doi:10.1177/1474651409355453.
70. Davenport C, Harper E, Forde H, Rochfort KD, Murphy RP, Smith D, Cummins PM. RANKL promotes osteoblastic activity in vascular smooth muscle cells by upregulating endothelial BMP-2 release. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;77:171-180. doi:10.1016/j.biocel.2016.06.009.
71. Mikhaylova L, Malmquist J, Nurminskaya M. Regulation of in vitro vascular calcification by BMP4, VEGF and Wnt3a. *Calcif Tissue Int*. 2007;81(5):372-381. doi:10.1007/s00223-007-9073-6.
72. Thomas IC, McClelland RL, Michos ED, Allison MA, Forbang NI, Longstreth WT, Post WS, Wong ND, Budoff MJ, Criqui MH. Density of calcium in the ascending thoracic aorta and risk of incident cardiovascular disease events. *Atherosclerosis*. 2017;265:190-196. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.09.009.
73. Jeziorska M, McCollum C, Wooley DE. Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *Virchows Arch Int J Pathol*. 1998;433(6):559-565.
74. Budoff MJ, Yu D, Nasir K, Mehrotra R, Chen L, Takasu J, Agrawal N, Liu ST, Blumenthal RS. Diabetes and progression of coronary calcium under the influence of statin therapy. *Am Heart J*. 2005;149(4):695-700. doi:10.1016/j.ahj.2004.07.034.
75. Block GA, Spiegel DM, Ehrlich J, Mehta R, Lindbergh J, Dreisbach A, Raggi P. Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. *Kidney Int*. 2005;68(4):1815-1824. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00600.x.
76. Cannata-Andia JB, Rodriguez-Garcia M, Carrillo-Lopez N, Naves-Diaz M, Diaz-Lopez B. Vascular Calcifications: Pathogenesis, Management, and Impact on Clinical Outcomes. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(12_suppl_3):S267-S273. doi:10.1681/ASN.2006080925.
77. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2004;286(5):E686-E696. doi:10.1152/ajpendo.00552.2003.
78. Schmermund A, Baumgart D, Mohlenkamp S, Kriener P, Pump H, Gronemeyer D, Seibel R, Erbel R. Natural History and Topographic Pattern of Progression of Coronary Calcification in Symptomatic Patients : An Electron-Beam CT Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(3):421-426. doi:10.1161/01.ATV.21.3.421.
79. Pohle K, Maffert R, Ropers D, Moshage W, Stilianakis N, Daniel WG, Achenbach S. Progression of Aortic Valve Calcification: Association With Coronary Atherosclerosis and Cardiovascular Risk Factors. *Circulation*. 2001;104(16):1927-1932. doi:10.1161/hc4101.097527.
80. Towler DA. Vascular Calcification: A Perspective On An Imminent Disease Epidemic. *IBMS BoneKEy*. 2008;5(2):41-58. doi:10.1138/20080298.

81. Okuno S, Ishimura E, Kitatani K, Fujino Y, Kohno K, Maeno Y, Maekawa K, Yamakawa T, Imanishi Y, Inaba M, Nishizawa Y. Presence of Abdominal Aortic Calcification Is Significantly Associated With All-Cause and Cardiovascular Mortality in Maintenance Hemodialysis Patients. *Am J Kidney Dis.* 2007;49(3):417-425. doi:10.1053/j.ajkd.2006.12.017.
82. Reaven PD, Sacks J, Investigators for the VADT. Coronary artery and abdominal aortic calcification are associated with cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2005;48(2):379-385. doi:10.1007/s00125-004-1640-z.
83. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Moe SM. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(12):3435-3442. doi:10.1093/ndt/gfl429.
84. Nelson RG, Gohdes DM, Everhart JE, Hartner JA, Zwemer FL, Pettitt DJ, Knowler WC. Lower-extremity amputations in NIDDM. 12-yr follow-up study in Pima Indians. *Diabetes Care.* 1988;11(1):8-16.
85. 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 Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2003;18(9):1731-1740.
86. Karwowski W, Naumnik B, Szczepański M, Myśliwiec M. The mechanism of vascular calcification - a systematic review. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2012;18(1):RA1-11.
87. Galimberti RL, Dos Ramos Farias E, Hidalgo Parra I, Algranati L, Kowalczyk A, Imperiali N, Greloni GC, Galimberti G. Cutaneous necrosis by calcific uremic arteriopathy. *Int J Dermatol.* 2005;44(2):101-106. doi:10.1111/j.1365-4632.2005.02169.x.
88. Lindman BR, Clavel M-A, Mathieu P, Lung B, Lancellotti P, Otto CM, Pibarot P. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primer.* March 2016:16006. doi:10.1038/nrdp.2016.6.
89. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP, Otto CM. Calcific Aortic Valve Disease: Not Simply a Degenerative Process: A Review and Agenda for Research From the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group * Executive Summary: Calcific Aortic Valve Disease - 2011 Update. *Circulation.* 2011;124(16):1783-1791. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.006767.
90. Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation.* 2001;103(11):1522-1528.
91. Rajamannan NM. Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype. *Circulation.* 2003;107(17):2181-2184. doi:10.1161/01.CIR.0000070591.21548.69.
92. Willens HJ, Chirinos JA, Schob A, Veerani A, Perez AJ, Chakko S. The Relation Between Mitral Annular Calcification and Mortality in Patients Undergoing Diagnostic Coronary Angiography. *Echocardiography.* 2006;23(9):717-722. doi:10.1111/j.1540-8175.2006.00300.x.
93. Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(3):317-332.

94. Qiao J-H, Mertens RB, Fishbein MC, Geller SA. Cartilaginous metaplasia in calcified diabetic peripheral vascular disease: Morphologic evidence of enchondral ossification. *Hum Pathol*. 2003;34(4):402-407. doi:10.1053/hupa.2003.72.
95. Nicholls SJ, Tuzcu EM, Wolski K, Sipahi I, Schoenhagen P, Crowe T, Kapadia SR, Hazen SL, Nissen SE. Coronary Artery Calcification and Changes in Atheroma Burden in Response to Established Medical Therapies. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(2):263-270. doi:10.1016/j.jacc.2006.10.038.
96. Callister TQ, Raggi P, Coil B, Lippolis NJ, Russo DJ. Effect of HMG-CoA Reductase Inhibitors on Coronary Artery Disease as Assessed by Electron-Beam Computed Tomography. *N Engl J Med*. 1998;339(27):1972-1978. doi:10.1056/NEJM199812313392703.
97. Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Reversibility of Calcitriol-Induced Medial Artery Calcification in Rats With Intact Renal Function. *J Bone Miner Res*. 2005;21(3):484-490. doi:10.1359/JBMR.051211.
98. Giachelli CM. Vascular Calcification Mechanisms. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(12):2959-2964. doi:10.1097/01.ASN.0000145894.57533.C4.
99. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors*. 2004;22(4):233-241. doi:10.1080/08977190412331279890.
100. Roedel EK, Schwarz E, Kanse SM. The Factor VII-activating Protease (FSAP) Enhances the Activity of Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2). *J Biol Chem*. 2013;288(10):7193-7203. doi:10.1074/jbc.M112.433029.
101. Balderman JAF, Lee H-Y, Mahoney CE, Handy DE, White K, Annis S, Lebeche D, Hajjar RJ, Loscalzo J, Leopold JA. Bone Morphogenetic Protein-2 Decreases MicroRNA-30b and MicroRNA-30c to Promote Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *J Am Heart Assoc*. 2012;1(6):e003905-e003905. doi:10.1161/JAHA.112.003905.
102. Yao Y, Bennett BJ, Wang X, Rosenfeld ME, Giachelli C, Lusis AJ, Bostrom KI. Inhibition of Bone Morphogenetic Proteins Protects Against Atherosclerosis and Vascular Calcification. *Circ Res*. 2010;107(4):485-494. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.219071.
103. Evrard S, Delanaye P, Kamel S, Cristol J-P, Cavalier E, Arnaud J, Zaoui P, Carlier MC, Laville M, Fouque D, Cavalier E, Delanaye P, Cristol JP, Bargnoux AS, Kamel S, Massy Z, Prié D, Urena-Torres P, Souberbielle JC, Boutten A, Guérin A, Hannedouche T, Jean G, Lafage-Proust MH, London G, Mercadal L, Pieroni L. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clin Chim Acta*. 2015;438:401-414. doi:10.1016/j.cca.2014.08.034.
104. Bostrom KI, Rajamannan NM, Towler DA. The Regulation of Valvular and Vascular Sclerosis by Osteogenic Morphogens. *Circ Res*. 2011;109(5):564-577. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.234278.
105. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):189-195. doi:10.1007/s00441-009-0832-8.
106. Zhang Y, Khan D, Delling J, Tobiasch E. Mechanisms Underlying the Osteo- and Adipo-Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Sci World J*. 2012;2012:1-14. doi:10.1100/2012/793823.

107. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular Calcification: Pathobiological Mechanisms and Clinical Implications. *Circ Res*. 2006;99(10):1044-1059. doi:10.1161/01.RES.0000249379.55535.21.
108. Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int*. 2003;63(3):1003-1011. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00820.x.
109. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang H-Y, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification: Upregulation of Cbfa1 and Downregulation of Smooth Muscle Lineage Markers. *Circ Res*. 2001;89(12):1147-1154. doi:10.1161/hh2401.101070.
110. Whyte MP. Hypophosphatasia and the Role of Alkaline Phosphatase in Skeletal Mineralization*. *Endocr Rev*. 1994;15(4):439-461. doi:10.1210/edrv-15-4-439.
111. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation*. 1999;100(21):2168-2176.
112. Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2004;15(6):1392-1401.
113. Khavandgar Z, Roman H, Li J, Lee S, Vali H, Brinckmann J, Davis EC, Murshed M. Elastin Haploinsufficiency Impedes the Progression of Arterial Calcification in MGP-Deficient Mice: ELASTIN CONTENT AND VASCULAR CALCIFICATION. *J Bone Miner Res*. 2014;29(2):327-337. doi:10.1002/jbmr.2039.
114. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, Muller-Esterl W, Schinke T, Jahnke-Dechent W. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest*. 2003;112(3):357-366. doi:10.1172/JCI17202.
115. Roy ME, Nishimoto SK. Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone*. 2002;31(2):296-302.
116. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386(6620):78-81. doi:10.1038/386078a0.
117. Yao Y, Shahbazian A, Bostrom KI. Proline and -Carboxylated Glutamate Residues in Matrix Gla Protein Are Critical for Binding of Bone Morphogenetic Protein-4. *Circ Res*. 2008;102(9):1065-1074. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.166124.
118. Schurgers LJ, Teunissen KJF, Knapen MHJ, Kwaijtaal M, van Diest R, Appels A, Reutelingsperger CP, Cleutjens JPM, Vermeer C. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(8):1629-1633. doi:10.1161/01.ATV.0000173313.46222.43.

119. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular Calcification: The Killer of Patients with Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(7):1453-1464. doi:10.1681/ASN.2008070692.
120. Ketteler M. Fetuin-A and extraosseous calcification in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14(4):337-342.
121. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Böhm R, Metzger T, Wanner C, Jahnhen-Dechent W, Floege J. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet Lond Engl*. 2003;361(9360):827-833. doi:10.1016/S0140-6736(03)12710-9.
122. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible Structures of SIBLING Proteins, Bone Sialoprotein, and Osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280(2):460-465. doi:10.1006/bbrc.2000.4146.
123. Morinobu M, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Yamamoto H, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin Expression in Osteoblasts and Osteocytes During Bone Formation Under Mechanical Stress in the Calvarial Suture In Vivo. *J Bone Miner Res*. 2003;18(9):1706-1715. doi:10.1359/jbmr.2003.18.9.1706.
124. Reza S, Shaukat A, Arain TM, Riaz QS, Mahmud M. Expression of Osteopontin in Patients with Thyroid Dysfunction. Alisi A, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e56533. doi:10.1371/journal.pone.0056533.
125. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1993;7(15):1475-1482.
126. Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, Fisher LW. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics*. 1990;7(4):491-502.
127. Kubota T, Zhang Q, Wrana JL, Ber R, Aubin JE, Butler WT, Sodek J. Multiple forms of Sppl (secreted phosphoprotein, osteopontin) synthesized by normal and transformed rat bone cell populations: regulation by TGF-beta. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;162(3):1453-1459.
128. Cho H-J, Cho H-J, Kim H-S. Osteopontin: A multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification. *Curr Atheroscler Rep*. 2009;11(3):206-213. doi:10.1007/s11883-009-0032-8.
129. Xuan J-W, Hota C, Shigeyama Y, D'Errico JA, Somerman MJ, Chambers AF. Site-directed mutagenesis of the arginine-glycine-aspartic acid sequence in osteopontin destroys cell adhesion and migration functions. *J Cell Biochem*. 1995;57(4):680-690. doi:10.1002/jcb.240570413.
130. Musso G, Paschetta E, Gambino R, Cassader M, Molinaro F. Interactions among bone, liver, and adipose tissue predisposing to diabetes and fatty liver. *Trends Mol Med*. 2013;19(9):522-535. doi:10.1016/j.molmed.2013.05.006.
131. Mehta BB, Sharma S, Vasishta RK, Sen RK, Sharma A, Luthra-Guptasarma M. Blocking osteopontin-fibronectin interactions reduce extracellular fibronectin deployment and arthritic immunopathology. *Int Immunopharmacol*. 2018;55:297-305. doi:10.1016/j.intimp.2017.12.028.

132. Martin SM, Schwartz JL, Giachelli CM, Ratner BD. Enhancing the biological activity of immobilized osteopontin using a type-1 collagen affinity coating. *J Biomed Mater Res.* 2004;70A(1):10-19. doi:10.1002/jbm.a.30052.
133. Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal.* 2009;3(3-4):311-322. doi:10.1007/s12079-009-0068-0.
134. Shinohara ML, Jansson M, Hwang ES, Werneck MBF, Glimcher LH, Cantor H. T-bet-dependent expression of osteopontin contributes to T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(47):17101-17106. doi:10.1073/pnas.0508666102.
135. Nakamachi T, Nomiyama T, Gizard F, Heywood EB, Jones KL, Zhao Y, Fuentes L, Takebayashi K, Aso Y, Staels B, Inukai T, Bruemmer D. PPAR Agonists Suppress Osteopontin Expression in Macrophages and Decrease Plasma Levels in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2007;56(6):1662-1670. doi:10.2337/db06-1177.
136. Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1993;92(4):1686-1696. doi:10.1172/JCI116755.
137. O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM, Giachelli CM. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol.* 1994;14(10):1648-1656.
138. Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Moroi M, Tada N, Ohsuzu F. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res.* 2002;91(1):77-82.
139. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol.* 1998;152(2):353-358.
140. Speer M, Chien Y, Quan M, Yang H, Vali H, Mckee M, Giachelli C. Smooth muscle cells deficient in osteopontin have enhanced susceptibility to calcification in vitro. *Cardiovasc Res.* 2005;66(2):324-333. doi:10.1016/j.cardiores.2005.01.023.
141. Nakamura H, Honda H, Inada Y, Kato N, Kato K, Kitazawa K, Sugisaki T. Osteopontin Expression in Vascular Smooth Muscle Cells in Patients With End-Stage Renal Disease. *Ther Apher Dial.* 2006;10(3):273-277. doi:10.1111/j.1744-9987.2006.00376.x.
142. Barreto DV, Lenglet A, Liabeuf S, Kretschmer A, Barreto FC, Nollet A, Slama M, Choukroun G, Brazier M, Massy Z. Prognostic Implication of Plasma Osteopontin Levels in Patients with Chronic Kidney Disease. *Nephron Clin Pract.* 2010;117(4):363-372. doi:10.1159/000321520.
143. Nitta K, Ishizuka T, Horita S, Hayashi T, Ajiro A, Uchida K, Honda K, Oba T, Kawashima A, Yumura W, Kabaya T, Akiba T, Nihei H. Soluble osteopontin and vascular calcification in hemodialysis patients. *Nephron.* 2001;89(4):455-458. doi:10.1159/000046119.
144. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* 2002;62(5):1724-1731. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00625.x.

145. Paloyan NJ, Leaf EM, Giachelli CM. Osteopontin protects against high phosphate-induced nephrocalcinosis and vascular calcification. *Kidney Int.* 2016;89(5):1027-1036. doi:10.1016/j.kint.2015.12.046.
146. Poggio P, Grau JB, Field BC, Sainger R, Seefried WF, Rizzolio F, Ferrari G. Osteopontin controls endothelial cell migration in vitro and in excised human valvular tissue from patients with calcific aortic stenosis and controls. *J Cell Physiol.* 2011;226(8):2139-2149. doi:10.1002/jcp.22549.
147. Ju W, Smith S, Kretzler M. Genomic biomarkers for chronic kidney disease. *Transl Res J Lab Clin Med.* 2012;159(4):290-302. doi:10.1016/j.trsl.2012.01.020.
148. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.
149. Levey AS, Perrone RD, Madias NE. Serum creatinine and renal function. *Annu Rev Med.* 1988;39:465-490. doi:10.1146/annurev.me.39.020188.002341.
150. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA.* 2007;298(17):2038-2047. doi:10.1001/jama.298.17.2038.
151. Matsushita K, Ballew SH, Astor BC, Jong PE de, Gansevoort RT, Hemmelgarn BR, Levey AS, Levin A, Wen C-P, Woodward M, Coresh J, Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Cohort profile: the chronic kidney disease prognosis consortium. *Int J Epidemiol.* 2013;42(6):1660-1668. doi:10.1093/ije/dys173.
152. Kramer A, Stel V, Zoccali C, Heaf J, Ansell D, Grönhagen-Riska C, Leivestad T, Simpson K, Pálsson R, Postorino M, Jager K, ERA-EDTA Registry. An update on renal replacement therapy in Europe: ERA-EDTA Registry data from 1997 to 2006. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2009;24(12):3557-3566. doi:10.1093/ndt/gfp519.
153. 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.
154. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N, European Uremic Toxin Work Group. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2005;20(6):1048-1056. doi:10.1093/ndt/gfh813.
155. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW, American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation.* 2003;108(17):2154-2169. doi:10.1161/01.CIR.0000095676.90936.80.

156. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 1998;32(5 Suppl 3):S112-119.
157. Russo D, Palmiero G, De Blasio AP, Balletta MM, Andreucci VE. Coronary artery calcification in patients with CRF not undergoing dialysis. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2004;44(6):1024-1030.
158. Kramer H, Toto R, Peshock R, Cooper R, Victor R. Association between chronic kidney disease and coronary artery calcification: the Dallas Heart Study. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2005;16(2):507-513. doi:10.1681/ASN.2004070610.
159. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med.* 2000;342(20):1478-1483. doi:10.1056/NEJM200005183422003.
160. Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Naves-Díaz M, Diaz-Lopez JB, Diaz-Corte C, Cannata-Andía JB, Asturias Study Group. Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2009;24(1):239-246. doi:10.1093/ndt/gfn466.
161. Kraśniak A, Drozd M, Pasowicz M, Chmiel G, Michałek M, Szumilak D, Podolec P, Klimeczek P, Koniecznyńska M, Wicher-Muniak E, Tracz W, Khoa TN, Souberbielle J-C, Druke TB, Sulowicz W. Factors involved in vascular calcification and atherosclerosis in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2007;22(2):515-521. doi:10.1093/ndt/gfl564.
162. Moe SM, Chen NX. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res.* 2004;95(6):560-567. doi:10.1161/01.RES.0000141775.67189.98.
163. Román-García P, Rodríguez-García M, Cabezas-Rodríguez I, López-Ongil S, Díaz-López B, Cannata-Andía JB. Vascular calcification in patients with chronic kidney disease: types, clinical impact and pathogenesis. *Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Health Sci Cent.* 2011;20(3):203-212. doi:10.1159/000323434.
164. Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H. Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2001;38(4 Suppl 1):S34-37.
165. Raggi P. Detection and quantification of cardiovascular calcifications with electron beam tomography to estimate risk in hemodialysis patients. *Clin Nephrol.* 2000;54(4):325-333.
166. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 1998;31(4):607-617.
167. Byon CH, Chen Y. Molecular Mechanisms of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: The Link between Bone and the Vasculature. *Curr Osteoporos Rep.* 2015;13(4):206-215. doi:10.1007/s11914-015-0270-3.
168. Bisson S-K, Ung R-V, Picard S, Valade D, Agharazii M, Larivière R, Mac-Way F. High calcium, phosphate and calcitriol supplementation leads to an osteocyte-like phenotype in calcified

- vessels and bone mineralisation defect in uremic rats. *J Bone Miner Metab.* March 2018. doi:10.1007/s00774-018-0919-y.
169. Lau WL, Linnes M, Chu EY, Foster BL, Bartley BA, Somerman MJ, Giachelli CM. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2013;28(1):62-69. doi:10.1093/ndt/gfs333.
170. Lomashvili K, Garg P, O'Neill WC. Chemical and hormonal determinants of vascular calcification in vitro. *Kidney Int.* 2006;69(8):1464-1470. doi:10.1038/sj.ki.5000297.
171. Li X, Yang H-Y, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2006;98(7):905-912. doi:10.1161/01.RES.0000216409.20863.e7.
172. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res.* 2005;96(7):717-722. doi:10.1161/01.RES.0000161997.24797.c0.
173. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnke-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. 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 JASN.* 2004;15(11):2857-2867. doi:10.1097/01.ASN.0000141960.01035.28.
174. Giachelli CM. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int.* 2009;75(9):890-897. doi:10.1038/ki.2008.644.
175. Vanholder RC, Glorieux GL, De Smet RV. Uremic toxins: removal with different therapies. *Hemodial Int Int Symp Home Hemodial.* 2003;7(2):162-167. doi:10.1046/j.1492-7535.2003.00033.x.
176. Vanholder R, De Smet R, Lameire N. Protein-bound uremic solutes: the forgotten toxins. *Kidney Int Suppl.* 2001;78:S266-270. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.59780266.x.
177. Viaene L, Annaert P, de Loor H, Poesen R, Evenepoel P, Meijers B. Albumin is the main plasma binding protein for indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate. *Biopharm Drug Dispos.* 2013;34(3):165-175. doi:10.1002/bdd.1834.
178. Lekawanvijit S, Kompa AR, Wang BH, Kelly DJ, Krum H. Cardiorenal syndrome: the emerging role of protein-bound uremic toxins. *Circ Res.* 2012;111(11):1470-1483. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.278457.
179. Lekawanvijit S, Adrahtas A, Kelly DJ, Kompa AR, Wang BH, Krum H. Does indoxyl sulfate, a uraemic toxin, have direct effects on cardiac fibroblasts and myocytes? *Eur Heart J.* 2010;31(14):1771-1779. doi:10.1093/eurheartj/ehp574.
180. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, Choukroun G, Vanholder R, Massy ZA, European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2009;4(10):1551-1558. doi:10.2215/CJN.03980609.

181. Gao H, Liu S. Role of uremic toxin indoxyl sulfate in the progression of cardiovascular disease. *Life Sci.* 2017;185:23-29. doi:10.1016/j.lfs.2017.07.027.
182. Vaziri ND, Zhao Y-Y, Pahl MV. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2016;31(5):737-746. doi:10.1093/ndt/gfv095.
183. Ellis RJ, Small DM, Vesey DA, Johnson DW, Francis R, Vitetta L, Gobe GC, Morais C. Indoxyl sulphate and kidney disease: Causes, consequences and interventions. *Nephrol Carlton Vic.* 2016;21(3):170-177. doi:10.1111/nep.12580.
184. Aronov PA, Luo FJ-G, Plummer NS, Quan Z, Holmes S, Hostetter TH, Meyer TW. Colonic contribution to uremic solutes. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2011;22(9):1769-1776. doi:10.1681/ASN.2010121220.
185. Itoh Y, Ezawa A, Kikuchi K, Tsuruta Y, Niwa T. Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and their effects on endothelial ROS production. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(7):1841-1850. doi:10.1007/s00216-012-5929-3.
186. Lin C-J, Liu H-L, Pan C-F, Chuang C-K, Jayakumar T, Wang T-J, Chen H-H, Wu C-J. Indoxyl sulfate predicts cardiovascular disease and renal function deterioration in advanced chronic kidney disease. *Arch Med Res.* 2012;43(6):451-456. doi:10.1016/j.arcmed.2012.08.002.
187. Davenport A. More frequent hemodialysis does not effectively clear protein-bound azotemic solutes derived from gut microbiome metabolism. *Kidney Int.* 2017;91(5):1008-1010. doi:10.1016/j.kint.2016.12.036.
188. FHN Trial Group, Chertow GM, Levin NW, Beck GJ, Depner TA, Eggers PW, Gassman JJ, Gorodetskaya I, Greene T, James S, Larive B, Lindsay RM, Mehta RL, Miller B, Ornt DB, Rajagopalan S, Rastogi A, Rocco MV, Schiller B, Sergeeva O, Schulman G, Ting GO, Unruh ML, Star RA, Klinger AS. In-center hemodialysis six times per week versus three times per week. *N Engl J Med.* 2010;363(24):2287-2300. doi:10.1056/NEJMoa1001593.
189. Sirich TL, Fong K, Larive B, Beck GJ, Chertow GM, Levin NW, Klinger AS, Plummer NS, Meyer TW, Frequent Hemodialysis Network (FHN) Trial Group. Limited reduction in uremic solute concentrations with increased dialysis frequency and time in the Frequent Hemodialysis Network Daily Trial. *Kidney Int.* 2017;91(5):1186-1192. doi:10.1016/j.kint.2016.11.002.
190. Luo FJ-G, Patel KP, Marquez IO, Plummer NS, Hostetter TH, Meyer TW. Effect of increasing dialyzer mass transfer area coefficient and dialysate flow on clearance of protein-bound solutes: a pilot crossover trial. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2009;53(6):1042-1049. doi:10.1053/j.ajkd.2009.01.265.
191. Meyer TW, Leeper EC, Bartlett DW, Depner TA, Lit YZ, Robertson CR, Hostetter TH. Increasing dialysate flow and dialyzer mass transfer area coefficient to increase the clearance of protein-bound solutes. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2004;15(7):1927-1935.
192. Meyer TW, Peattie JWT, Miller JD, Dinh DC, Recht NS, Walther JL, Hostetter TH. Increasing the clearance of protein-bound solutes by addition of a sorbent to the dialysate. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2007;18(3):868-874. doi:10.1681/ASN.2006080863.

193. Niwa T, Tsukushi S, Ise M, Miyazaki T, Tsubakihara Y, Owada A, Shiigai T. Indoxyl sulfate and progression of renal failure: effects of a low-protein diet and oral sorbent on indoxyl sulfate production in uremic rats and undialyzed uremic patients. *Miner Electrolyte Metab.* 1997;23(3-6):179-184.
194. Menon V, Kopple JD, Wang X, Beck GJ, Collins AJ, Kusek JW, Greene T, Levey AS, Sarnak MJ. Effect of a very low-protein diet on outcomes: long-term follow-up of the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2009;53(2):208-217. doi:10.1053/j.ajkd.2008.08.009.
195. Ito S, Yoshida M. Protein-Bound Uremic Toxins: New Culprits of Cardiovascular Events in Chronic Kidney Disease Patients. *Toxins.* 2014;6(12):665-678. doi:10.3390/toxins6020665.
196. Yamaguchi J, Tanaka T, Inagi R. Effect of AST-120 in Chronic Kidney Disease Treatment: Still a Controversy? *Nephron.* 2017;135(3):201-206. doi:10.1159/000453673.
197. Toyoda S, Kikuchi M, Komatsu T, Hori Y, Nakahara S, Kobayashi S, Sakai Y, Inoue T, Taguchi I. Impact of the oral adsorbent AST-120 on oxidative stress and uremic toxins in high-risk chronic kidney disease patients. *Int J Cardiol.* 2014;177(2):705-707. doi:10.1016/j.ijcard.2014.09.196.
198. Fujii H, Nishijima F, Goto S, Sugano M, Yamato H, Kitazawa R, Kitazawa S, Fukagawa M. Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents progression of cardiac damage in chronic kidney disease through suppression of oxidative stress. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2009;24(7):2089-2095. doi:10.1093/ndt/gfp007.
199. Fujii H, Yonekura Y, Yamashita Y, Kono K, Nakai K, Goto S, Sugano M, Goto S, Fujieda A, Ito Y, Nishi S. Anti-oxidative effect of AST-120 on kidney injury after myocardial infarction. *Br J Pharmacol.* 2016;173(8):1302-1313. doi:10.1111/bph.13417.
200. Lekawanvijit S, Kompa AR, Manabe M, Wang BH, Langham RG, Nishijima F, Kelly DJ, Krum H. Chronic kidney disease-induced cardiac fibrosis is ameliorated by reducing circulating levels of a non-dialysable uremic toxin, indoxyl sulfate. *PLoS One.* 2012;7(7):e41281. doi:10.1371/journal.pone.0041281.
201. Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-636. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
202. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2004;15(8):1983-1992. doi:10.1097/01.ASN.0000132474.50966.DA.
203. Hatamizadeh P, Fonarow GC, Budoff MJ, Darabian S, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Cardiorenal syndrome: pathophysiology and potential targets for clinical management. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(2):99-111. doi:10.1038/nrneph.2012.279.
204. Yu M, Kim YJ, Kang D-H. Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2011;6(1):30-39. doi:10.2215/CJN.05340610.
205. Ito S, Higuchi Y, Yagi Y, Nishijima F, Yamato H, Ishii H, Osaka M, Yoshida M. Reduction of indoxyl sulfate by AST-120 attenuates monocyte inflammation related to chronic kidney disease. *J Leukoc Biol.* 2013;93(6):837-845. doi:10.1189/jlb.0112023.

206. Adelibieke Y, Shimizu H, Muteliefu G, Bolati D, Niwa T. Indoxyl sulfate induces endothelial cell senescence by increasing reactive oxygen species production and p53 activity. *J Ren Nutr Off J Counc Ren Nutr Natl Kidney Found*. 2012;22(1):86-89. doi:10.1053/j.jrn.2011.10.027.
207. Schroeder JC, Dinatale BC, Murray IA, Flaveny CA, Liu Q, Laurenzana EM, Lin JM, Strom SC, Omiecinski CJ, Amin S, Perdew GH. The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor. *Biochemistry (Mosc)*. 2010;49(2):393-400. doi:10.1021/bi901786x.
208. Koizumi M, Tatebe J, Watanabe I, Yamazaki J, Ikeda T, Morita T. Aryl hydrocarbon receptor mediates indoxyl sulfate-induced cellular senescence in human umbilical vein endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*. 2014;21(9):904-916.
209. Ito S, Osaka M, Edamatsu T, Itoh Y, Yoshida M. Crucial Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) in Indoxyl Sulfate-Induced Vascular Inflammation. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23(8):960-975. doi:10.5551/jat.34462.
210. Adelibieke Y, Yisireyili M, Ng H-Y, Saito S, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate induces IL-6 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells through OAT3-mediated uptake and activation of AhR/NF- κ B pathway. *Nephron Exp Nephrol*. 2014;128(1-2):1-8. doi:10.1159/000365217.
211. Gondouin B, Cerini C, Dou L, Sallée M, Duval-Sabatier A, Pletinck A, Calaf R, Lacroix R, Jourde-Chiche N, Poitevin S, Arnaud L, Vanholder R, Brunet P, Dignat-George F, Burtey S. Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Kidney Int*. 2013;84(4):733-744. doi:10.1038/ki.2013.133.
212. Covic A, Kanbay M, Voroneanu L, Turgut F, Serban DN, Serban IL, Goldsmith DJ. Vascular calcification in chronic kidney disease. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2010;119(3):111-121. doi:10.1042/CS20090631.
213. Shroff R, Long DA, Shanahan C. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2013;24(2):179-189. doi:10.1681/ASN.2011121191.
214. Muteliefu G, Shimizu H, Enomoto A, Nishijima F, Takahashi M, Niwa T. Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell senescence with upregulation of p53, p21, and prelamin A through oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;303(2):C126-134. doi:10.1152/ajpcell.00329.2011.
215. Adijiang A, Goto S, Uramoto S, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(6):1892-1901. doi:10.1093/ndt/gfm861.
216. Chen J, Zhang X, Zhang H, Liu T, Zhang H, Teng J, Ji J, Ding X. Indoxyl Sulfate Enhance the Hypermethylation of Klotho and Promote the Process of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Int J Biol Sci*. 2016;12(10):1236-1246. doi:10.7150/ijbs.15195.
217. Wu Y, Han X, Wang L, Diao Z, Liu W. Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell calcification via the JNK/Pit-1 pathway. *Ren Fail*. 2016;38(10):1702-1710. doi:10.3109/0886022X.2016.1155397.

218. Zhang H, Chen J, Shen Z, Gu Y, Xu L, Hu J, Zhang X, Ding X. Indoxyl sulfate accelerates vascular smooth muscle cell calcification via microRNA-29b dependent regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Toxicol Lett.* 2018;284:29-36. doi:10.1016/j.toxlet.2017.11.033.
219. Freise C, Kretzschmar N, Querfeld U. Wnt signaling contributes to vascular calcification by induction of matrix metalloproteinases. *BMC Cardiovasc Disord.* 2016;16(1). doi:10.1186/s12872-016-0362-8.
220. Seo MY, Yang J, Lee JY, Kim K, Kim SC, Chang H, Won NH, Kim M-G, Jo S-K, Cho W, Kim HK. Renal Klotho expression in patients with acute kidney injury is associated with the severity of the injury. *Korean J Intern Med.* 2015;30(4):489. doi:10.3904/kjim.2015.30.4.489.
221. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, Argiles A, European Uremic Toxin Work Group. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2012;23(7):1258-1270. doi:10.1681/ASN.2011121175.
222. Chapman RW, Minnicozzi M, Celly CS, Phillips JE, Kung TT, Hipkin RW, Fan X, Rindgen D, Deno G, Bond R, Gonsiorek W, Billah MM, Fine JS, Hey JA. A novel, orally active CXCR1/2 receptor antagonist, Sch527123, inhibits neutrophil recruitment, mucus production, and goblet cell hyperplasia in animal models of pulmonary inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;322(2):486-493. doi:10.1124/jpet.106.119040.
223. Gouron R, Petit L, Boudot C, Six I, Brazier M, Kamel S, Mentaverri R. Osteoclasts and their precursors are present in the induced-membrane during bone reconstruction using the Masquelet technique. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11(2):382-389. doi:10.1002/term.1921.
224. Muteliefu G, Enomoto A, Niwa T. Indoxyl sulfate promotes proliferation of human aortic smooth muscle cells by inducing oxidative stress. *J Ren Nutr Off J Counc Ren Nutr Natl Kidney Found.* 2009;19(1):29-32. doi:10.1053/j.jrn.2008.10.014.
225. Sciarretta S, Valenti V, Tocci G, Pontremoli R, Rosei EA, Ambrosioni E, Costa V, Leonetti G, Pessina AC, Trimarco B, Chin D, Paneni F, Deferrari G, Ferrucci A, Volpe M. Association of renal damage with cardiovascular diseases is independent of individual cardiovascular risk profile in hypertension: data from the Italy-Developing Education and awareness on MicroAlbuminuria in patients with hypertensive Disease study: *J Hypertens.* 2010;28(2):251-258. doi:10.1097/HJH.0b013e3283326718.
226. Kendrick J, Chonchol MB. Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2008;4(12):672-681. doi:10.1038/ncpneph0954.
227. Wu M, Rementer C, Giachelli CM. Vascular Calcification: An Update on Mechanisms and Challenges in Treatment. *Calcif Tissue Int.* 2013;93(4):365-373. doi:10.1007/s00223-013-9712-z.
228. Qunibi W, Moustafa M, Muenz LR, He DY, Kessler PD, Diaz-Buxo JA, Budoff M. A 1-Year Randomized Trial of Calcium Acetate Versus Sevelamer on Progression of Coronary Artery Calcification in Hemodialysis Patients With Comparable Lipid Control: The Calcium Acetate Renegel Evaluation-2 (CARE-2) Study. *Am J Kidney Dis.* 2008;51(6):952-965. doi:10.1053/j.ajkd.2008.02.298.
229. Lin H-H, Liou H-H, Wu M-S, Lin C-Y, Huang C-C. Long-term sevelamer treatment lowers serum fibroblast growth factor 23 accompanied with increasing serum Klotho levels in chronic

- haemodialysis patients: Effect of sevelamer on Klotho and FGF23. *Nephrology*. 2014;19(11):672-678. doi:10.1111/nep.12319.
230. McCullough PA. Annual Progression of Coronary Calcification in Trials of Preventive Therapies: A Systematic Review. *Arch Intern Med*. 2009;169(22):2064. doi:10.1001/archinternmed.2009.382.
231. Adijiang A, Higuchi Y, Nishijima F, Shimizu H, Niwa T. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, promotes cell senescence in aorta of hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;399(4):637-641. doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.130.
232. Burton DGA, Matsubara H, Ikeda K. Pathophysiology of vascular calcification: Pivotal role of cellular senescence in vascular smooth muscle cells. *Exp Gerontol*. 2010;45(11):819-824. doi:10.1016/j.exger.2010.07.005.
233. Chitalia VC, Shivanna S, Martorell J, Balcells M, Bosch I, Kolandaivelu K, Edelman ER. Uremic Serum and Solutes Increase Post-Vascular Interventional Thrombotic Risk Through Altered Stability of Smooth Muscle Cell Tissue Factor. *Circulation*. 2013;127(3):365-376. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.118174.
234. Yamamoto H, Tsuruoka S, Ioka T, Ando H, Ito C, Akimoto T, Fujimura A, Asano Y, Kusano E. Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*. 2006;69(10):1780-1785. doi:10.1038/sj.ki.5000340.
235. Vanholder R, Schepers E, Pletinck A, Nagler EV, Glorieux G. The Uremic Toxicity of Indoxyl Sulfate and p-Cresyl Sulfate: A Systematic Review. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(9):1897-1907. doi:10.1681/ASN.2013101062.
236. Abbasian N, Burton JO, Herbert KE, Tregunna B-E, Brown JR, Ghaderi-Najafabadi M, Brunskill NJ, Goodall AH, Bevington A. Hyperphosphatemia, Phosphoprotein Phosphatases, and Microparticle Release in Vascular Endothelial Cells. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(9):2152-2162. doi:10.1681/ASN.2014070642.
237. Di Marco GS, König M, Stock C, Wiesinger A, Hillebrand U, Reiermann S, Reuter S, Amler S, Köhler G, Buck F, Fobker M, Kümpers P, Oberleithner H, Hausberg M, Lang D, Pavenstädt H, Brand M. High phosphate directly affects endothelial function by downregulating annexin II. *Kidney Int*. 2013;83(2):213-222. doi:10.1038/ki.2012.300.
238. Olmos G, Martínez-Miguel P, Alcalde-Estevez E, Medrano D, Sosa P, Rodríguez-Mañas L, Naves-Díaz M, Rodríguez-Puyol D, Ruiz-Torres MP, López-Ongil S. Hyperphosphatemia induces senescence in human endothelial cells by increasing endothelin-1 production. *Aging Cell*. 2017;16(6):1300-1312. doi:10.1111/acel.12664.
239. Oude Nijhuis CSM, Vellenga E, Daenen SMGJ, Kamps WA, De Bont ESJM. Endothelial cells are main producers of interleukin 8 through Toll-like receptor 2 and 4 signaling during bacterial infection in leukopenic cancer patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(4):558-563.
240. Anand AR, Cucchiari M, Terwilliger EF, Ganju RK. The Tyrosine Kinase Pyk2 Mediates Lipopolysaccharide-Induced IL-8 Expression in Human Endothelial Cells. *J Immunol*. 2008;180(8):5636-5644. doi:10.4049/jimmunol.180.8.5636.

241. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2009;84(3):353-360. doi:10.1093/cvr/cvp241.
242. Stinghen AEM, Gonçalves SM, Martines EG, Nakao LS, Riella MC, Aita CA, Pecoits-Filho R. Increased Plasma and Endothelial Cell Expression of Chemokines and Adhesion Molecules in Chronic Kidney Disease. *Nephron Clin Pract*. 2009;111(2):c117-c126. doi:10.1159/000191205.
243. Ribeiro V, Bosquetti B, Gonçalves SM, Bucharles SGE, Rempel L, Maciel RAP, Oliveira RB de, Pecoits-Filho R, Stinghen AEM. Uremic serum inhibits *in vitro* expression of chemokine SDF-1: impact of uremic toxicity on endothelial injury. *J Bras Nefrol*. 2014;36(2):123-131. doi:10.5935/0101-2800.20140021.
244. Drüeke TB, Massy ZA. Atherosclerosis in CKD: differences from the general population. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6(12):723-735. doi:10.1038/nrneph.2010.143.
245. Kiu Weber CI, Duchateau-Nguyen G, Solier C, Schell-Steven A, Hermosilla R, Nogoceke E, Block G. Cardiovascular risk markers associated with arterial calcification in patients with chronic kidney disease Stages 3 and 4. *Clin Kidney J*. 2014;7(2):167-173. doi:10.1093/ckj/sfu017.
246. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: A Multifunctional Molecule Regulating Chronic Inflammation and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(11):2302-2309. doi:10.1161/ATVBAHA.107.144824.
247. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang H-Y, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification *in vivo*. *J Exp Med*. 2002;196(8):1047-1055.
248. Lau WL, Leaf EM, Hu MC, Takeno MM, Kuro-o M, Moe OW, Giachelli CM. Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet. *Kidney Int*. 2012;82(12):1261-1270. doi:10.1038/ki.2012.322.
249. Gonsiorek W, Fan X, Hesk D, Fossetta J, Qiu H, Jakway J, Billah M, Dwyer M, Chao J, Deno G, Taveras A, Lundell DJ, Hipkin RW. Pharmacological Characterization of SCH527123, a Potent Allosteric CXCR1/CXCR2 Antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(2):477-485. doi:10.1124/jpet.106.118927.
250. Dwyer MP, Yu Y, Chao J, Aki C, Chao J, Biju P, Girijavallabhan V, Rindgen D, Bond R, Mayer-Ezel R, Jakway J, Hipkin RW, Fossetta J, Gonsiorek W, Bian H, Fan X, Terminelli C, Fine J, Lundell D, Merritt JR, Rokosz LL, Kaiser B, Li G, Wang W, Stauffer T, Ozgur L, Baldwin J, Taveras AG. Discovery of 2-Hydroxy- *N,N*-dimethyl-3-{2-[[*(R)*]-1-(5-methylfuran-2-yl)propyl]amino}-3,4-dioxocyclobut-1-enylamino}benzamide (SCH 527123): A Potent, Orally Bioavailable CXCR2/CXCR1 Receptor Antagonist. *J Med Chem*. 2006;49(26):7603-7606. doi:10.1021/jm0609622.
251. Planagumà A, Domènech T, Pont M, Calama E, García-González V, López R, Aulí M, López M, Fonquerna S, Ramos I, de Alba J, Nueda A, Prats N, Segarra V, Miralpeix M, Lehner MD. Combined anti CXC receptors 1 and 2 therapy is a promising anti-inflammatory treatment for respiratory diseases by reducing neutrophil migration and activation. *Pulm Pharmacol Ther*. 2015;34:37-45. doi:10.1016/j.pupt.2015.08.002.

252. Rennard SI, Dale DC, Donohue JF, Kanniss F, Magnussen H, Sutherland ER, Watz H, Lu S, Stryszak P, Rosenberg E, Staudinger H. CXCR2 Antagonist MK-7123. A Phase 2 Proof-of-Concept Trial for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(9):1001-1011. doi:10.1164/rccm.201405-0992OC.
253. Reyat JS, Tomlinson MG, Noy PJ. Utilizing Lentiviral Gene Transfer in Primary Endothelial Cells to Assess Lymphocyte-Endothelial Interactions. In: Rainger GE, Mcgettrick HM, eds. *T-Cell Trafficking*. Vol 1591. New York, NY: Springer New York; 2017:155-168. doi:10.1007/978-1-4939-6931-9_11.
254. VandenDriessche T, Chuah MK. Targeting endothelial cells by gene therapy. *Blood*. 2013;122(12):1993-1994. doi:10.1182/blood-2013-08-518266.

Valorisation du travail

1. Communications affichées:

- ❖ 1^{ère} journée de la FHU REMOD-VHF (Early Markers of Cardiovascular Remodeling in Valvulopathy and Heart Failure). Mai 2017, Rouen, France.
- ❖ 2^{ème} journée de la FHU REMOD-VHF (Early Markers of Cardiovascular Remodeling in Valvulopathy and Heart Failure). Mai 2018, Rouen, France.
- ❖ Congrès annuel de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique. Juin 2018, Toulouse, France

2. Communications orales:

- ❖ 5^{ème} édition de la Journée Amiénoise de Recherche en Santé. Octobre 2016, Amiens, France.
- ❖ 2^{ème} journée de la FHU REMOD-VHF (Early Markers of Cardiovascular Remodeling in Valvulopathy and Heart Failure). Mai 2018, Rouen, France.
- ❖ 28th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection. Juin 2018, Barçalona, Spain.

3. Article

- ❖ Bouabdallah J, Zibara K, Issa H, Lenglet G, Kchour G, Caus T, Six I, Choukroun G, Kamel S and Bennis Y. Endothelial cells exposed to phosphate and indoxyl sulfate secrete interleukin-8 which downregulates osteopontin and promotes vascular calcification. *Nephrology Dialysis Transplantation*, juin 2018. Article accepté.