



HAL
open science

Athérosclérose et sténose valvulaire aortique : implication des macrophages et des cellules interstitielles de valve dans les calcifications cardiovasculaires

Mickael Rosa

► **To cite this version:**

Mickael Rosa. Athérosclérose et sténose valvulaire aortique : implication des macrophages et des cellules interstitielles de valve dans les calcifications cardiovasculaires. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S046 . tel-03931402

HAL Id: tel-03931402

<https://theses.hal.science/tel-03931402>

Submitted on 9 Jan 2023

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

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

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

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

DISCIPLINE : Physiologie, Physiopathologie, Biologie systémique médicale

SPECIALITE : Biologie Cellulaire

**ATHÉROSCLÉROSE ET STÉNOSE VALVULAIRE AORTIQUE
IMPLICATION DES MACROPHAGES ET DES CELLULES
INTERSTITIELLES DE VALVES DANS LES
CALCIFICATIONS CARDIOVASCULAIRES**

Thèse soutenue publiquement le 19 décembre 2016 par

Mickael ROSA

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Bart STAELS

Président du Jury

Monsieur le Professeur Jean-Baptiste MICHEL

Rapporteur

Monsieur le Professeur David SMADJA

Rapporteur

Madame le Professeur Sophie SUSEN

Directrice de thèse

Ce n'est qu'une parenthèse...



Remerciements

*Je souhaite tout d'abord remercier les Professeurs **Brigitte Jude** et **Sophie Susen** pour m'avoir accueilli en stage de master 1 au sein de l'EA2693. Je tiens également à remercier le Professeur **Bart Staels**, directeur de l'unité UMR1011 et président du jury de thèse pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces travaux de thèse au sein de son laboratoire.*

*Je souhaite adresser ma gratitude à ma directrice de thèse Madame le Professeur **Sophie Susen**. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée en me confiant ce projet de thèse et les missions annexes qui en ont découlées. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance pour les discussions que nous avons eues, vos précieux conseils et votre soutien. J'ai beaucoup apprécié réaliser ma thèse sous votre direction où votre rigueur et votre sens critique seront de vrais atouts pour ma future carrière.*

*Messieurs les Professeurs **Jean-Baptiste Michel** et **David Smadja**, vous me faites l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance, ma gratitude et mon profond respect.*

*Je remercie également **la Région Hauts de France, le CHRU de Lille et la Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA)** pour m'avoir financé au long de cette thèse.*

*Je remercie le Professeur **Annabelle Dupont** qui m'a accompagné depuis le Master 1. Vous m'avez donné l'opportunité de mener un projet parallèle et complémentaire à mon sujet de thèse. Je vous suis très reconnaissant pour ce que vous m'avez appris et pour la confiance que vous m'avez témoignée.*

*Madame le Professeur **Giulia Chinetti-Gbaguidi**, je tenais à vous remercier pour avoir co-dirigé cette thèse durant la première année. Les événements de la vie ont fait que nos chemins scientifiques se sont ensuite séparés ... pour se retrouver au cours de la troisième année et ce très beau projet sur lequel vous m'avez permis de travailler. Merci pour votre confiance, votre présence et tout ce que vous m'avez appris.*

*Messieurs le Professeur **André Vincentelli** et Docteur **Francis Juthier**, je vous remercie pour avoir fourni le matériel biologique nécessaire à ces études et pour les discussions clinico-scientifiques que nous avons eues au long des différentes « réunions SAVE » (même*

quand ces réunions ne portaient pas sur ce projet) qui ont ponctué mes années de master et de thèse (pour paraphraser Sophie : (scientifique=praticien)=chercheur).

Je remercie Madame le Docteur **Delphine Corseaux**, pour son aide précieuse, son partage de connaissances méthodologiques et son soutien

Merci à Monsieur le Docteur **Madjid Tagzirt** pour son expertise scientifique, ses conseils au cours des réunions de travail et sa grande disponibilité

Je tiens à remercier Messieurs les Docteurs **Ahmed Elkalioubie**, **Rodrigo Lorenzi** et **Yoann Sottejeau**, les postdocs qui ont jalonné ma thèse et m'ont apporté chacun une quantité incroyable de connaissances, de techniques et savoir faire scientifiques et non-scientifiques

Merci aux Docteurs **Charlotte Lavisse-Roma** et **Anaïs Arbesu Y Miar** pour avoir partagé ces quelques années, avoir supporté mon caractère « particulier » et m'avoir soutenu.

Je remercie le Docteur **Jérôme Eeckhoute** et **Céline Gheeraert** pour m'avoir initié aux mondes de la biologie moléculaire et de la bioinformatique.

Un grand merci à **Jonathan Vanhoutte** et **Corinne Copin**. Partager votre bureau au cours de ma troisième année de thèse a été une très belle expérience. Merci à Jonathan pour sa précieuse aide technique, ses conseils et avis toujours justes. Corinne, reçoit ici toute ma gratitude pour les innombrables heures passées sous le PSM à m'apprendre la rigueur de l'isolement et la culture des monocytes/macrophages, ou sous la hotte pour les nombreuses extractions que nous avons pu faire. Merci pour tout.

Merci à **Bertrand Vaast** et **Bruno Derudas** pour les millions de qPCR faites sur les différents projets menés au long de cette thèse.

A Yann, François, Sarah, Mathilde, Salah, Alexis, courage pour la continuation de vos travaux, je n'ai aucun doute sur votre réussite future ! A Camille, Claire, Fédé, Sami, bravo pour l'obtention de ce Graal, en espérant à mon tour rejoindre le club des docteurs...

Je remercie également tous les autres membres de feu l'EA2693 et de l'U1011 avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à discuter de sciences et pas seulement.

A ma famille et mes amis :

Je remercie évidemment ma mère, qui m'a soutenu dans tous mes choix mais qui nous a malheureusement quittés avant de voir que son fils était capable de passer le cap de la première année d'Université.

Un grand merci à mon père et mon frère, qui même s'ils se demandent encore si Doctorant est un métier, m'ont poussé à aller jusqu'au bout de mon parcours

Merci à Yann, Marie, ma filleule Marie-Ange, Virginie, Kevin, Matthieu, David, Greg, tous mes amis choristes et musiciens (Décibel, Enharmonie, les LPP...), qui ont partagé les échecs et réussites rencontrés tout au long de mon sinueux chemin universitaire et m'ont changé les idées au travers de la musique

Petite pensée pour Maxime qui a partagé le bureau perpendiculaire au mien pendant un an, qui a subi mes chansons insupportables et les jets de rouleaux de scotch... et qui sera mon colocataire dans ma nouvelle vie de l'autre côté de l'atlantique : Désolé pour toi !

Publications et communications

Publications

- A. Elkalioubie, S Haulon, A Duhamel, M. Rosa, A Rauch, B Staels, S; Susen, E. Van Belle, A. Dupont. Meta-Analysis of Abdominal Aortic Aneurysm in Patients With Coronary Artery Disease. Am J Cardiol. 2015 Nov 1;116(9):1451-6.

Communications en congrès

Orales

- M. Rosa, R. Lorenzi, A. Elkalioubie, M. Tagzirt, F. Juthier, R. Jashari, A. Rauch, A. Arbesu y Miar, D. Corseaux, A. Vincentelli, B. Staels, E. Van Belle, S. Susen, A. Dupont. Implication of leptin in the development of Calcific Aortic Valve Disease: induction of osteoblast differentiation of human valvular interstitial cells via the Akt and ERK pathways. 2nd annual scientific meeting of the Heart Valve Society (HVS), New-York (Etats-Unis), Mars 2016.

- M. Rosa, R. Lorenzi, A. Elkalioubie, M. Tagzirt, F. Juthier, D. Corseaux, D. Smadja, R. Jashari, A. Rauch, B. Staels, E. Van Belle, S. Susen, A. Dupont. A new role for leptin in calcific aortic valve disease via direct effects on human aortic valvular interstitial cells. 11th annual congress of the Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA), Biarritz (France), Juin 2015.

- M. Rosa, A. Elkalioubie, A. Arbesu Y Miar, R. Lorenzi, D. Corseaux, M. Tagzirt, C. Roma, C. Zawadzki, F. Juthier, A. Vincentelli, D. Smadja, B. Staels, G. Chinetti-Gbaguidi, B. Jude, E. Van Belle, S. Susen, A. Dupont. Leptin and its receptor in human calcific aortic valve: expression and functional implication. Printemps de la cardiologie, Strasbourg (France), Avril 2014.

Affichées

- M. Rosa, R. Lorenzi, M. Tagzirt, F. Juthier, R. Jashari, D. Corseaux, B. Staels, E. Van Belle, S. Susen, A. Dupont. Leptin effects on osteoblast differentiation of human valvular interstitial cells: New insight into calcific aortic valve disease. Annual congress of the American Heart Association (AHA), Orlando (Etats-Unis); Novembre 2015.

- M. Rosa, A. Elkalioubie, M. Tagzirt, F. Juthier, D. Smadja, B. Staels, G. Chinetti-Gbaguidi, S. Susen, E. Van Belle, A. Dupont . Leptin is expressed in human calcific aortic valves and promotes osteoblastic differentiation of aortic valvular interstitial cells: a new regulatory mechanism of valvular calcification. Annual congress of the European Society of Cardiology (ESC), Barcelone (Espagne), Aout- Septembre 2014.

- M. Rosa, A. Elkalioubie, A. Arbesu Y Miar, R. Lorenzi, D. Corseaux, M. Tagzirt, C. Roma, C. Zawadzki, F. Juthier, A. Vincentelli, D. Smadja, B. Staels, G. Chinetti-Gbaguidi, B. Jude, E. Van Belle, S. Susen, A. Dupont. Leptin and its receptor in human calcific aortic valve: expression and functional implication. Printemps de la cardiologie, Strasbourg (France), Avril 2014.

Liste des abréviations	10
Résumé	13
Abstract	15
<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	17
<i>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	20
CHAPITRE I. PATHOLOGIES IMPLIQUEES DANS LA SURVENUE DE CALCIFICATIONS	
CARDIOVASCULAIRES	21
I.1 L'ATHEROSCLEROSE	21
I.1.1 Généralités	21
I.1.1.1 Définition	21
I.1.1.2 Epidémiologie	22
I.1.1.3 Manifestations de l'athérosclérose	22
I.1.1.4 Facteurs de risque	24
I.1.2 Physiopathologie de l'athérosclérose	28
I.1.2.1 Structure d'une artère normale	28
I.1.2.2 Classification des lésions athéroscléreuses	29
I.1.2.3. Phénotype de la plaque	31
I.1.2.4. Données historiques	32
I.1.2.5 Connaissances actuelles	33
I.1.2.5 Traitements de l'athérosclérose	38
I.1.3 Polarisation des monocytes/macrophages	41
I.2 Sténose Valvulaire Aortique	48
I.2.1. Généralités	48
I.2.1.1 Définition	48
I.2.1.2. Epidémiologie	50
I.2.1.3. Facteurs de risque	51
I.2.2. Physiopathologie de la SVA	52
I.2.2.1 Structure de la valve aortique normale	52
I.2.2.2 Classification de la sténose aortique	55
I.2.2.3 Compréhension actuelle des processus impliqués dans la SVA	56
I.2.2.4. Traitements de la SVA	62
I.2.3. Les cellules interstitielles de valve (VIC)	65
CHAPITRE II CALCIFICATIONS CARDIOVASCULAIRES	67

II.1 Epidémiologie _____	67
II.2 Physiologie générale de l'ostéogenèse _____	68
II.3 Processus impliqués dans la calcification artérielle _____	71
OBJECTIFS _____	80
TRAVAUX DE RECHERCHE _____	83
Les macrophages alternatifs humains de type M2 peuplent les zones calcifiées des lésions athéroscléreuses et présentent une activité de resorption osseuse induite par le RANKL altérée _____	84
Résumé _____	85
Introduction _____	86
Résultats _____	88
Les macrophages localisés autour des zones calcifiées de plaques d'athérosclérose humaine sont des macrophages alternatifs CD68 ⁺ MR ⁺ . _____	88
Les macrophages alternatifs M2 présentent une altération du profil d'expression des marqueurs ostéoclastiques. _____	88
Les macrophages de type M2 polarisés par l'IL-4 présentent une expression de RANK importante. _____	89
L'activité osteoclastique induite par RANKL/MCSF est déficiente dans les macrophages M2 _____	89
L'expression de Blimp1, régulateur de l'expression de la CTSK, est moins élevée dans les M2 que dans les RM. _____	90
La leptine induit la différenciation ostéoblastique des cellules interstitielles de valve aortique via les voies de signalisation Akt et ERK _____	95
Résumé _____	96
Introduction _____	98
Résultats _____	99
Les patients atteints de SVA présentent des taux sériques de leptines plus élevés _____	99
Les niveaux de leptine et de ses récepteurs sont plus élevés dans les zones calcifiées que dans les zones non calcifiées des valves aortiques sténosées _____	99
La leptine favorise le phénotype ostéoblastique des VIC de manière leptine dépendante des voies Akt et ERK _____	99
Discussion _____	101

Rôle de l'aldéhyde déshydrogénase 1A1 dans la sténose valvulaire aortique: Implication de l'acide rétinoïque dans la différentiation ostéoblastique des cellules interstitielles de valve	104
Introduction	105
Méthodes	105
Analyse transcriptomique	105
Validation des résultats	106
Histologie et immunohistochimie	107
Stimulation des VIC par l'acide rétinoïque	108
Résultats de l'analyse transcriptomique	109
Résultats : implication de l'ALDH1A1 dans la SVA	114
Discussion	118
CONCLUSION GENERALE	121
Bibliographie	128
Annexes	157

Liste des abréviations

α SMA : 'alpha smooth muscle actin
AAA: anévrisme de l'aorte abdominale
ABCC6 : ATP-binding cassette sub-family C member 6
ADP : adénosine di-phosphate
AGE : agents de glycation avancés
ALDH1A1 : aldéhyde déshydrogénase 1A1
AMP : adénosine mono-phosphate
AOMI : Artériopathie oblitérante des membres inférieurs
APO : apolipoprotéine
AR: Acide rétinoïque
ATP : adénosine triphosphate
AVC : accident vasculaire cérébral
Bcl6 : B-cell lymphoma 6
Blimp1 : B lymphocyte-induced maturation protein-1
BMP-2 ; bone morphogenetic protein 2
CA2 : carbonic anhydrase 2
CD : cluster of differentiation
CML : cellules musculaires lisses
CTSK : cathepsine K
CVC : Calcifying Vascular Cells
ERK : extracellular signal–regulated kinases
FGF-23 : fibroblast growth factor
hbFGF: human basic Fibroblast Growth Factor
HDL : high density lipoprotein
HDL-C : HDL-cholestérol

hEGF : human Epidermal Growth Factor
HIF1 α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha
ICAM1 : intercellular adhesion molecule I
IDL intermediary density lipoprotein
IDM : infarctus du myocarde
IL-6 : interleukine 6
IMC : indice de masse corporelle
IRF8 : Interferon Regulatory Factor-8
kDa : kilo Daltons
KLF4 : Kruppel-like factor 4
LDL : low density lipoprotein
LDL-C : LDL-cholestérol
Lp(a) : lipoprotéine (a)
LPS : lipopolysaccharide
MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1
MEC : matrice extra cellulaire
MGP : matrix Gla protein
MMP :Matrix Metalloprotéinases
MR : Mannose receptor
N5TE : ecto-5'-nucleotidase
NFATc-1 : Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1
NO : monoxyde d'azote
NPC1L1 : Niemann-Pick C1-Like 1
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OPG : ostéoprotégérine
PF4 : Platelet Factor 4
PFA : paraformaldehyde

RANK : Receptor Activator of Nuclear Factor κ B
RANKL : Receptor Activator of Nuclear Factor κ B ligand
RAR : Retinoic acid receptor
ROS : Reactive oxygen species
RUNX2 : Runt-related transcription factor 2
RXR : retinoid X receptor
SM : syndrome métabolique
SVA : Sténose valvulaire aortique
SVF : sérum de veau fœtal
TAVI : Transcatheter Aortic Valve Implantation
TGF β : transforming growth factor beta
TNF α : tumour necrosis factor alpha
TRAP : tartrate-resistant acid phosphatase
VEC : Valvular endothelial cells
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VIC : valvular interstitial cells
VLDL : very low density lipoprotein

Résumé

Les pathologies cardiovasculaires sont le plus souvent l'aboutissement des processus liés à l'athérosclérose. Elles représentent la première cause de morbi-mortalité dans le monde et leur incidence s'accroît avec le vieillissement de la population et l'expansion de facteurs de risques comme le diabète ou l'obésité. La sténose valvulaire aortique (SVA) est la valvulopathie la plus fréquente dans les pays développés présentant de nombreux points communs avec l'athérosclérose vasculaire. En plus des facteurs de risque, les lésions valvulaires et les lésions vasculaires partagent des similitudes dans les processus physiopathologiques impliqués comme l'inflammation, la fibrose, l'angiogenèse et la calcification. Ce dernier processus apparaît dans les stades avancés des pathologies liées à l'athérosclérose et joue un rôle critique *via* son implication dans la stabilité de la plaque ou l'épaississement des cuspidés valvulaires aortiques. Les macrophages, cellules issues de la différenciation des monocytes infiltrés, jouent un rôle prépondérant dans ces lésions *via* les phénotypes classiques (M1) et alternatifs (M2). Néanmoins cette dichotomie ne reflète pas complètement la variété de leur plasticité et les différents phénotypes induits notamment par le microenvironnement des monocytes/macrophages (zones riches en lipides, zones riches en fer ou zones riches en calcification). Dans la valve aortique, les cellules interstitielles de valve (VIC) forment la population cellulaire la plus présente au sein de la valve aortique. Ces cellules jouent un rôle déterminant dans le maintien du tissu valvulaire, mais également dans les processus de calcification menant à la SVA. Dans un premier temps, cette thèse a pour but d'étudier la capacité des macrophages à former des ostéoclastes, cellules responsables de la dégradation de la matrice osseuse, au sein des plaques d'athérosclérose. Dans un second temps, ce travail se focalisera sur les processus de calcification de la valve aortique *via* l'étude du rôle de la leptine dans les calcifications valvulaires (étude *a priori*) puis dans une étude transcriptomique *sans a priori* de VIC issues de valve sténosées et non-sténosées. Nos résultats sur les macrophages montrent *ex vivo* que les cellules en bordure des calcifications vasculaires sont des macrophages alternatifs de type M2. *In vitro*, ces cellules sont incapables de se différencier en ostéoclastes et de résorber une matrice osseuse. Pour l'étude de l'effet de la leptine sur les VIC, nous montrons que la leptine sérique

est plus élevée chez des patients présentant une SVA, nous confirmons que la leptine et son récepteur sont exprimés au sein des valves aortiques et que la leptine favorise la différenciation ostéoblastique des VIC de manière dépendante des voies Akt et ERK. Enfin, l'étude transcriptomique a permis de mettre en évidence une nouvelle voie métabolique dérégulée dans les VIC, la voie de l'aldéhyde déshydrogénase 1A1, carrefour du métabolisme de l'acide rétinoïque. Cette enzyme est sous exprimée dans les VIC issues de valves pathologiques et dans les zones calcifiées des valves aortiques sténosées. Par ailleurs, le traitement des VIC par l'acide rétinoïque en milieu procalcifiant inhibe la calcification.

Cette thèse met en avant de nouveaux indices sur les processus de calcification observés dans les plaques d'athérosclérose et les valves aortiques sténosées. Ces résultats décrivent l'impossibilité des M2 à former des ostéoclastes capables de résorber les calcifications. Il sera intéressant d'étudier le phénotype des macrophages en bordure des calcifications des valves aortiques sténosées. D'autre part, il sera intéressant d'étudier l'origine de la leptine dans la valve et son mécanisme d'action sur les VIC. Enfin, ce travail a mis à jour une nouvelle voie métabolique, impliquée dans le développement des calcifications valvulaires, qui pourrait constituer une voie thérapeutique innovante dans le traitement médicamenteux de la SVA.

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are the most often outcome of atherosclerosis processes. CVD are the first leading cause of death rate with an increasing incidence due to ageing populations and expansion of risk factors such as diabetes mellitus or obesity. Aortic valve stenosis (AVS) is the most frequent valvulopathy in developed countries sharing common points with vascular atherosclerosis. More than only risk factors, valvular and vascular lesions share common pathophysiological processes implicated in the development of the disease such as inflammation, fibrosis, angiogenesis and calcification. This last process appears in late stages of atherosclerosis diseases and play critical roles *via* implication in plaque stability or thickening of the aortic valve. Macrophages are cells deriving from infiltrated monocytes, playing an important role in the inflammatory state of lesions *via* classical (M1) or alternative phenotypes (M2) phenotypes. Nevertheless, this dichotomy does not reflect completely the variety of their plasticity and different phenotypes induced by the microenvironment of monocytes/macrophages (lipid riche zone, iron riche zone or calcium rich zone). In the aortic valve, valvular interstitial cells (VIC) are the most prominent cell type found in the aortic valve. These cells play a major role not only in the valve tissue homeostasis but also in the calcification processes leading to AVS. In a first part, the aim of this thesis is to elucidate the ability of macrophages to differentiate into osteoclasts, cell type responsible for bone matrix remodeling, inside atherosclerosis plaques. In a second part, this work will focus on the calcification processes occurring in the aortic valve *via* the study of the role of leptin in valvular calcification (association study) and then in a transcriptomic analysis of VIC isolated from calcified versus non calcified aortic valves (genome-wide expression study). Our results about macrophages show that *ex vivo* cell surrounding vascular calcification are alternative M2 macrophages. *In vitro*, these cells are no able to differentiate into true osteoclasts nor to resorb calcium deposits. Concerning the role of leptin on VIC, the results show that serum leptin is higher in patients with AVS, leptin and its receptors are expressed in the aortic valves and leptin enhances the osteoblast différenciation of VIC in an Akt and ERK dependant manner. Finally, the transcriptomic analysis allowed to highlight a new pathway deregulated in VIC, the aldehyde dehydrogenase 1A1, an enzyme implicated in retinoic acid metabolism. This enzyme is underexpressed in VIC isolated from calcified aortic valves and in the

calcified zones of stenosed aortic valves. Otherwise, treating VIC with retinoic acid in a procalcifying medium inhibits calcification processes.

This thesis highlights new insights into the calcification processes occurring in atherosclerosis lesions and calcified aortic valves. These results describe that M2 macrophages cannot differentiate into osteoclasts and reverse calcification formation inside atherosclerosis plaques. In parallel, it would be interesting to study the macrophages phenotypes surrounding calcium deposits in stenosed aortic valves. Then, it will be interesting to decipher the origin of leptin and its precise mechanism of action on VIC. Finally this work points out a new metabolic pathway implicated in the development of valvular calcification which could be a medical treatment of SVA.

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. L'athérosclérose, responsable de la majorité de ces pathologies, correspond à un remaniement de la paroi des artères de gros et moyen calibres du à l'accumulation de lipides et à des processus inflammatoires complexes impliquant les cellules immunitaires circulantes et les cellules résidentes de ces vaisseaux. Ces lésions vont diminuer la lumière des vaisseaux conduisant aux évènements cardiovasculaires aigus. Parmi les cellules immunitaires impliquées dans l'athérogenèse, les macrophages dérivés des monocytes jouent un rôle majeur dans le développement de la lésion, notamment *via* la diversité de phénotypes fonctionnels qu'ils sont capables d'acquérir.

Les calcifications vasculaires apparaissent dans les stades avancés de la physiopathologie de l'athérosclérose. Elles vont alors réduire l'élasticité artérielle et porter atteinte à l'hémodynamique cardiovasculaire. Les calcifications vasculaires sont maintenant reconnues comme un processus dynamique régulé et partageant de nombreux points communs avec la formation des os. L'hypothèse actuelle repose sur la balance entre les activités de type ostéoblastique et ostéoclastique, cette dernière empêchant les dépôts phosphocalciques dans les vaisseaux. Les ostéoclastes sont de larges cellules multinucléées dérivant des précurseurs des monocytes/macrophages. Dans une première partie, nous essaierons de comprendre le rôle de ces cellules dans les calcifications vasculaires en caractérisant le phénotype de macrophages observés en bordure des calcifications sur des coupes histologiques de plaques carotidiennes puis en étudiant *in vitro* le phénotype fonctionnel de monocytes/macrophages différenciés en cellules ostéoclastiques.

La sténose valvulaire aortique (SVA) est la troisième pathologie cardiaque la plus fréquente derrière la maladie coronarienne et l'hypertension. La SVA correspond à la phase symptomatique de la dégénérescence fibro-calcique de la valve aortique. Longtemps décrite comme une dégénérescence passive de la valve aortique, il est maintenant montré que la SVA partage de fortes similitudes avec l'athérosclérose au niveau physiopathologique. Le principal constituant cellulaire de la valve aortique est

les Valvular Interstitial Cells (VIC). Ce sont des cellules n'exprimant pas de marqueur macrophagique ni de marqueur de cellules endothéliales, en grande partie responsables de l'homéostasie tissulaire et qui présentent d'importantes capacités de différenciation. Elles peuvent, entre autres, se différencier en cellules calcifiantes de type ostéoblastique *in vitro* mais également *in vivo* modulant les processus de calcification menant à la SVA. De nombreuses cytokines peuvent influencer sur la différenciation de ces cellules. Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons étudié l'implication de la leptine sur le développement de la SVA. Cette adipokine sécrétée par le tissu adipeux est connue pour être un facteur de risque cardiovasculaire. De plus, il a été démontré que la leptine peut moduler les processus de calcification dans les pathologies athéroscléreuses. Ainsi, après avoir dosé la leptine sérique chez des patients atteints ou non de SVA, nous avons étudié son expression au sein de valves aortiques sténosées et étudié ses effets cellulaires sur les VIC.

Enfin, il est clairement établi que la différenciation ostéoblastique des VIC vers un phénotype calcifiant est un processus clé dans le développement de la SVA. Peu d'études sans a priori ont pour l'instant tenté de découvrir de nouvelles voies métaboliques impliquées dans ces processus de différenciation. Ainsi, pour mieux comprendre les événements moléculaires menant les VIC normales à se différencier en VIC ostéoblastiques, nous avons mené une étude transcriptomique sur des cellules isolées de valves normales et sténosées. Après validation de la cible d'intérêt, nous confirmerons sa présence au sein de valves aortiques normales et sténosées. Enfin, nous analyserons son implication dans la différenciation ostéoblastique des VIC et les processus de calcification.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. PATHOLOGIES IMPLIQUEES DANS LA SURVENUE DE CALCIFICATIONS CARDIOVASCULAIRES

I.1 L'ATHEROSCLEROSE

L'athérosclérose est définie comme une pathologie chronique de la paroi des artères qui, selon sa localisation, peut être la cause d'évènements cardiovasculaires comme des infarctus du myocarde (IDM), des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou encore l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI).

Les pathologies liées à l'athérosclérose sont actuellement associées à une importante morbi-mortalité et constituent un problème de santé publique majeur à mieux comprendre.

I.1.1 Généralités

I.1.1.1 Définition

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) décrit l'athérosclérose comme « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre, consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaires; le tout s'accompagnant de modifications de la media ». Bien que correcte, cette définition n'évoque pas toute la complexité propre à l'athérosclérose. Les lésions initiales, la progression de ces lésions ou encore leurs possibles complications ne sont pas abordées, cette définition présentant uniquement les particularités des lésions athéroscléreuses évoluées. Ainsi, l'athérosclérose est aujourd'hui décrite comme une pathologie inflammatoire chronique, définie par différents stades dont l'évolution lente aboutit à la formation de plaques au sein des artères.

1.1.1.2 Epidémiologie

Aujourd'hui, les maladies cardiovasculaires, dans lesquelles l'athérosclérose joue un rôle prépondérant, représentent la première cause de mortalité dans le monde. L'OMS estime à 17,5 millions le nombre de décès annuel dans le monde dus aux pathologies cardiovasculaires, soit plus de 30% de la mortalité annuelle mondiale totale. Parmi ces décès, 7,4 millions sont dus à une maladie coronarienne et 6,7 millions aux AVC. En Europe, et notamment en France, les maladies cardiovasculaires figurent au deuxième rang des causes de décès, derrière les cancers (Townsend, Wilson et al. 2016)

1.1.1.3 Manifestations de l'athérosclérose

La maladie athéroscléreuse débute chez le jeune enfant avec l'apparition de stries lipidiques, stade initial de la maladie (Napoli, D'Armiento et al. 1997). A ce stade, soit cette lésion asymptomatique disparaît, soit elle évolue vers une lésion complexe plus grave. Ce processus d'évolution est généralement lent, se déroulant sur plusieurs années. Ces stries lipidiques sont la manifestation de l'accumulation de macrophages ayant migré dans la paroi artérielle au niveau de l'intima dans le but de résorber l'infiltration de cholestérol associé aux Low Density Lipoprotein (LDL). Ces macrophages dériveront alors en cellules spumeuses riches en gouttelettes lipidiques cytoplasmiques. Ce premier stade de la pathologie est retrouvé chez 50% des hommes de plus de 15 ans. Ces lésions primaires se développeront ensuite pour devenir des plaques d'athérosclérose (ou athérome) (Stary, Chandler et al. 1995). Ces lésions peuvent être stables ou instables. Les plaques instables auront alors tendance à se rompre, conduisant à la formation, au niveau de la zone de rupture, d'un thrombus artériel qui, s'il obstrue complètement la lumière du vaisseau, mènera à de graves accidents cardiovasculaires aigus (Libby 2002).

L'athérosclérose est la cause de pathologies cardiovasculaires comme la maladie coronarienne ou l'IDM. Ces lésions apparaissent généralement dans les artères de gros et moyens calibres, dans les zones de courbure de troncs artériels et les zones

de bifurcations. En fonction du type et de la situation anatomique des lésions, les présentations cliniques seront différentes.

Les principales atteintes sont :

- Artères coronaires : l'obstruction de ces artères peut entraîner de l'angor instable, des syndromes coronaires aigus, un IDM ou une cardiopathie ischémique.
- Artères carotides : le rétrécissement des artères carotides peut induire une hypoperfusion cérébrale. La rupture d'une plaque dans ces artères peut conduire à la formation d'un thrombus dont les embolies peuvent obstruer des vaisseaux de plus petits calibres et déclencher un AVC ou infarctus cérébral.
- Artères des membres inférieurs : les plaques d'athérosclérose se développant au niveau de ces artères sont à l'origine d'une AOMI pouvant mener à une ischémie aiguë du membre voire une ischémie chronique.

Mais on retrouve également l'athérosclérose ou ses conséquences au niveau d'autres territoires :

- Aorte: le développement de la plaque d'athérosclérose au sein d'une partie affaiblie de la paroi d'une artère peut entraîner une dilatation de la paroi appelée anévrisme. Le siège de ce type d'athérosclérose est principalement l'aorte abdominale.
- Valve aortique : les processus impliqués dans l'athérosclérose, quand ils ont lieu au sein de la valve aortique vont aboutir à l'épaississement des feuillets de la valve constituant alors un obstacle à l'éjection du sang durant la systole et conduisant à une sténose valvulaire aortique (SVA).

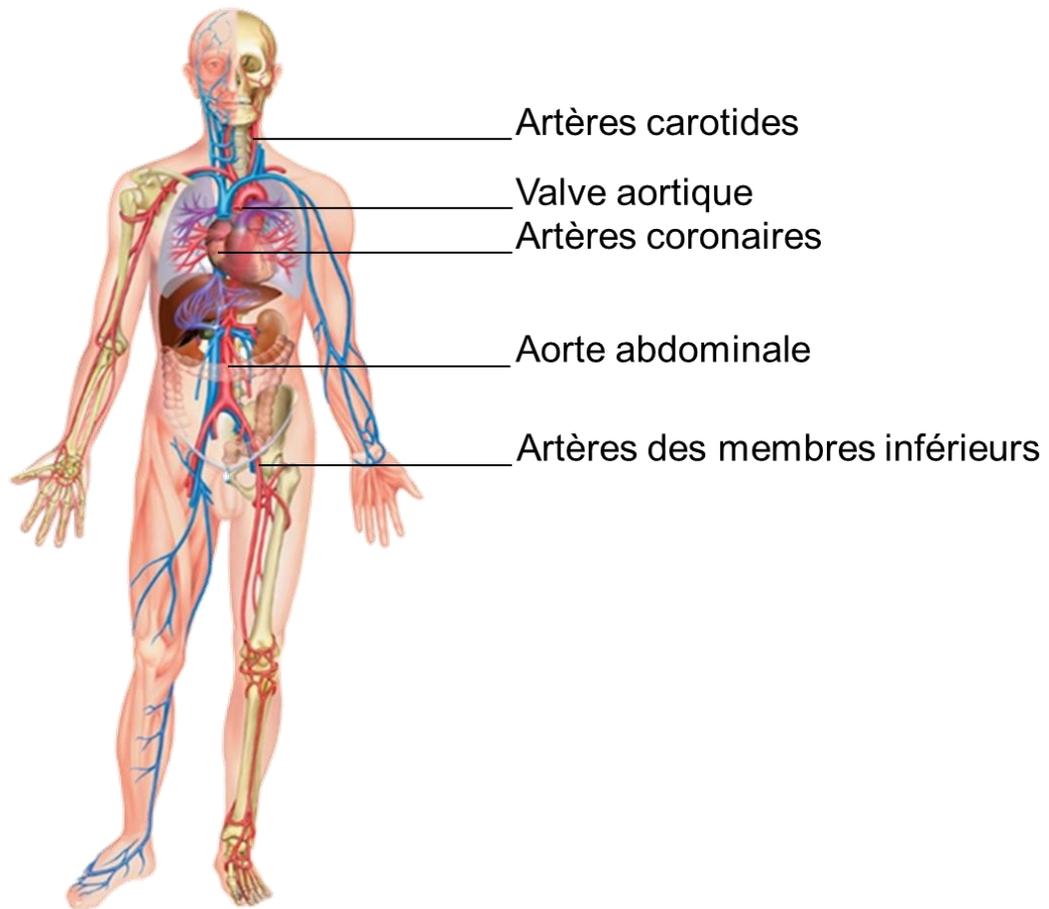


Figure 1 : Schéma des principaux sites d'apparition des lésions athéroscléreuses

1.1.1.4 Facteurs de risque

De nombreux paramètres influencent le développement de l'athérosclérose. Ces paramètres sont appelés facteurs de risque. Certains sont non modifiables comme l'âge, le sexe et l'hérédité et d'autres sont environnementaux et modifiables (régime alimentaire riche en graisses et en sucres, tabagisme, stress, sédentarité...). Ils pourront favoriser l'apparition d'une hypertension artérielle, de dyslipidémies, d'un diabète de type 2 ou de l'obésité. L'ensemble de ces facteurs de risque cardiovasculaires participent à une survenue des lésions plus précoce et favorisent la progression des lésions athéroscléreuses (Lusis 2000).

La notion de syndrome métabolique (SM) regroupe ces perturbations métaboliques prédisposant au développement des pathologies cardiovasculaires. L'atteinte par ce syndrome est définie par la présence chez le patient de trois paramètres parmi les

suivants : indice de masse corporelle (IMC) >30 kg/m² ; obésité abdominale (tour de taille > 102 cm chez l'homme, >88 cm chez la femme) ; triglycérides >1,7 mmol/L ; HDL < 1,04 mmol/L chez l'homme, < 1,29 mmol/L chez la femme; hypertension > 130/85 mmHg; glycémie à jeun > 6,1 mmol/L. Les patients présentant un SM ont une probabilité de survenue d'accident cardiovasculaire quatre fois plus importante que ceux sans SM (McEvoy, Meyer et al. 2005).

Il est clairement établi que les hommes ont un risque athéroscléreux plus élevé que les femmes. Cette différence est expliquée, en partie, par le rôle bénéfique des œstrogènes sur le profil lipidique. Avec la ménopause, cette protection disparaît et décale l'âge de survenue des complications athéroscléreuses chez la femme (Wittelman, Grobbee et al. 1989). Ainsi, l'âge est considéré comme un facteur de risque chez l'homme à partir de 50 ans et chez la femme à partir de 60 ans, selon les recommandations de 2012 de la Haute Autorité de Santé. A l'âge et le sexe, il faut ajouter, comme facteur de risque non modifiable, le déterminisme génétique. Les antécédents familiaux de maladie cardiovasculaire représentent un facteur de risque dont l'importance augmente avec l'âge de survenue chez le parent du premier degré. Plus cet âge est précoce chez le parent (survenue avant 55 ans chez le père ou avant 65 ans chez la mère), plus le risque cardiovasculaire est important chez le patient.

L'hypertension artérielle, définie comme une pression artérielle systolique supérieure à 140 mmHg ou une pression diastolique supérieure à 90 mmHg, est un autre facteur de risque cardiovasculaire important. Son implication dans l'athérogenèse est essentiellement mécanique : 1) L'hypertension induit des forces importantes au niveau de la paroi des vaisseaux et provoque des lésions de la couche interne des artères servant ainsi de point de départ à l'infiltration des LDL. Les plaques se développant, l'artère se rigidifie et entretient l'hypertension ; 2) l'hypertension induit l'expression d'angiotensine II. Cette protéine aux effets vasoconstricteurs favorise l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL-6) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CML) ou encore l'expression de protéines d'adhérence comme la vascular cell adhesion molecule VCAM-1 par les cellules endothéliales (Ross 1999).

Le tabac contribue également au développement de l'athérosclérose. Le monoxyde d'azote (NO) ou encore la nicotine composant la fumée de cigarette induiront un stress oxydant important menant à la peroxydation des lipides et à la modification des LDL ainsi qu'à une dysfonction endothéliale (Zeiher, Schachinger et al. 1995). Outre ces effets, le tabagisme augmentera également la production de tumor necrosis factor alpha (TNF α) et d'IL-6 par le tissu adipeux ou encore celle de la CRP. (Van Gaal, Mertens et al. 2006).

Le diabète de type 2, plus souvent rencontré chez des sujets d'âge avancé, est souvent associé à d'autres facteurs de risque cardiovasculaire (dyslipidémie, hypertension artérielle, obésité...). L'hyperglycémie rencontrée dans le diabète de type 2 favorisera la formation d'agents de glycation avancés (AGE) engendrant une inflammation de la paroi artérielle, étape clé du développement de l'athérosclérose (Schmidt, Yan et al. 1999). Chez les patients diabétiques, il a d'ailleurs été établi que les plaques d'athérosclérose sont plus étendues, plus vulnérables et présentent une population macrophagique différente en comparaison avec des patients non diabétiques (Hong, Jeong et al. 2009), (Roma-Lavisse, Tagzirt et al. 2015).

Dans la circulation sanguine, les lipides sont transportés par les lipoprotéines. Ces lipoprotéines sont classées selon leur densité VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) IDL (intermediary density lipoprotein) et HDL (high density lipoprotein). Un bilan lipidique chez un sujet sain présente des valeurs de LDL-cholestérol (LDL-C) <1,6 g/l, triglycérides <1,4 g/l et HDL-cholestérol (HDL-C) >0,4 g/L chez l'homme ou >0,5 g/L chez la femme.

Il est maintenant clair qu'une dyslipidémie (anomalies des taux plasmatiques de lipides), et notamment l'hypercholestérolémie, est un facteur de risque cardiovasculaire majeur. En effet, des études épidémiologiques ont montré qu'une concentration élevée en LDL et en triglycérides avec une faible concentration en HDL représente un facteur de risque pour les pathologies cardiovasculaires (Ginsberg and Tuck 2001). L'oxydation de ces LDL est un élément initiateur des processus pro-athérogènes notamment l'inflammation.

Enfin, l'obésité, notamment l'obésité abdominale, est une des composantes du syndrome métabolique. Un sujet est considéré comme obèse si son indice de masse corporelle ($IMC = \text{taille} / \text{poids}^2$) est supérieur à 30 kg/m^2 , on parlera d'obésité morbide quand l'IMC dépasse 40 kg/m^2 . L'obésité abdominale prédispose à la dyslipidémie, au diabète et à la résistance à l'insuline (Klein, Allison et al. 2007). Les adipocytes formant le tissu adipeux sécrètent de nombreuses cytokines appelées adipokines comme la leptine ou l'adiponectine qui modulent le métabolisme tissulaire des lipides et du glucose et modulent la sensibilité à l'insuline. Des taux plasmatiques élevés de leptine sont indépendamment associés à la sévérité des lésions coronaires (Hasan-Ali, Abd El-Mottaleb et al. 2011), (Zeng, Xu et al. 2014). En 2001, l'étude WOSCOPS a démontré que des taux élevés de leptine étaient prédictifs d'évènements coronariens chez des hommes, de façon indépendante de l'IMC (Wallace, McMahon et al. 2001). Dans un modèle animal d'athérosclérose, l'administration de leptine recombinante accélère l'apparition des plaques d'athérome et de thromboses (Wallace, McMahon et al. 2001). Ce tissu adipeux viscéral est une source importante de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou le TNF α , elles aussi impliquées dans le développement de l'athérosclérose (Van Gaal, Mertens et al. 2006).

Ces facteurs de risque étant modifiables, il est possible d'influer sur leur implication dans l'athérosclérose. Ainsi, des mesures hygiéno-diététiques, comme le sevrage tabagique, l'activité physique régulière ou le suivi d'un régime permettront de lutter contre ces facteurs de risque afin d'éviter la survenue d'évènements cardiovasculaires.

I.1.2 Physiopathologie de l'athérosclérose

I.1.2.1 Structure d'une artère normale

La paroi des artères s'organise en 3 couches (tuniques) concentriques qui possèdent chacune des particularités distinctes. De la lumière du vaisseau vers l'extérieur, ces tuniques se nomment l'intima, la media et l'adventice.

La tunique la plus interne, l'intima, est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales séparée du sous-endothélium par une membrane basale riche en collagène IV, en laminine et en protéoglycanes. Longtemps décrit comme une simple enveloppe régulant l'hémostase, l'endothélium est désormais considéré comme une véritable glande endocrine. En condition physiologique, l'endothélium synthétisera du NO qui aura diverses fonctions comme la relaxation des CML sous-jacentes, l'inhibition de l'adhérence des cellules immunitaires ou l'agrégation plaquettaire (Raij 2006). La dysfonction endothéliale est donc un évènement clé dans l'apparition des processus athéroscléreux.

Le sous endothélium est composé de collagène et de fibres élastiques et de quelques éléments cellulaires comme les CML et les macrophages. C'est au niveau de cet espace sous-endothélial que les plaques d'athérome se développeront. L'intima est séparée de la media par une membrane riche en fibres d'élastine appelée « lamelle élastique interne » (Woods, Oh et al. 1998).

La media est la tunique la plus épaisse des artères contenant les CML disposées en couches concentriques. Cette couche intermédiaire est composée de matrice extracellulaire riche en collagène, de fibres élastiques, de glycoprotéines et de protéoglycanes (Zalewski, Shi et al. 2002). La media est séparée de l'adventice par la « lamelle élastique externe », uniquement retrouvée dans les artères de gros calibres.

L'adventice, couche la plus externe des artères, permet l'ancrage du vaisseau aux structures avoisinantes. Cette tunique est composée de tissu conjonctif lâche, de

fibres élastiques et de fibroblastes. Elle renferme également les vasa vasorum, système capillaire des vaisseaux de gros calibres, ainsi que des fibres nerveuses du système nerveux sympathique et parasympathique.

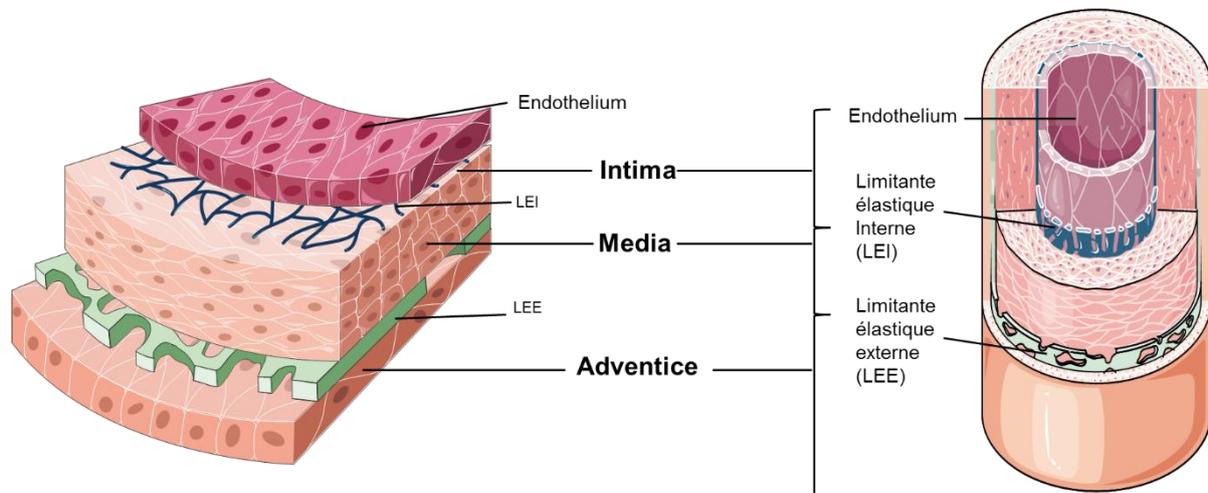


Figure 2 : Représentation schématique de la paroi artérielle normale

D'après Stevens et al, 1997

1.1.2.2 Classification des lésions athéroscléreuses

L'athérosclérose peut être schématisée en trois stades évolutifs consécutifs : la strie lipidique, la lésion fibrolipidique et la lésion compliquée. La prise en compte de la complexité anatomo-pathologique de l'athérosclérose a abouti à une classification des lésions comprenant 6 principaux types de lésion de gravité croissante (Stary, Chandler et al. 1995). Cette classification a été modifiée et affinée depuis les années 2000 (Virmani, Kolodgie et al. 2000), (Naghavi, Libby et al. 2003), (Libby, Ridker et al. 2002).

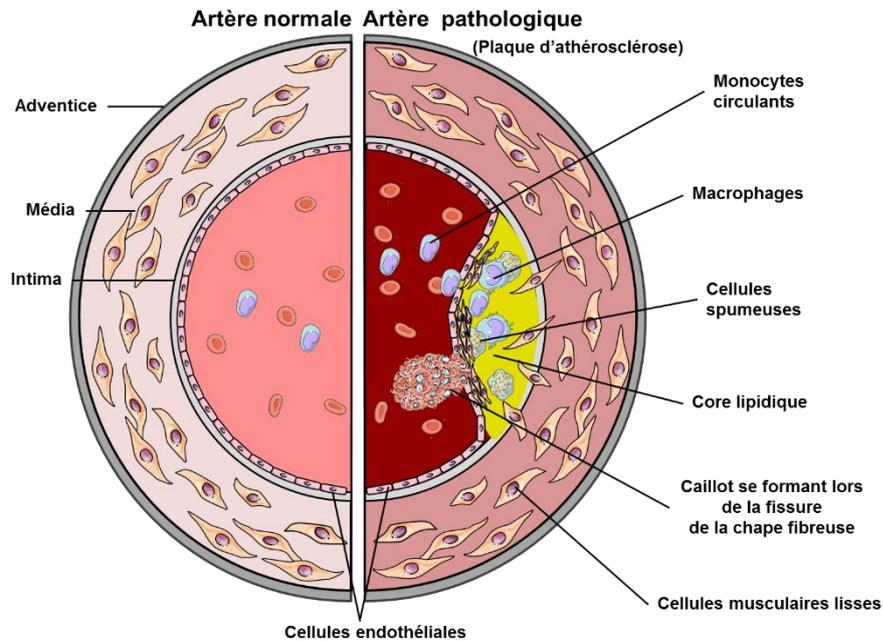


Figure 3 : Schéma du remaniement d'une artère au cours de l'athérosclérose

Tableau I : Stades évolutifs et caractéristiques des lésions d'athérosclérose selon la classification de l'American Heart Association (Stary 2000), illustrations d'après Libby (Libby, Ridker et al. 2002)

Type de lésions et descriptif				Age d'apparition	Clinique
Lésions précoces	I. Lésion initiale	Cellules spumeuses isolées		Dès les premières semaines de vie - 15 ans	Asymptomatique
	II. Stries lipidiques	Accumulation de cellules spumeuses en amas dans la couche sous endothéliale de l'intima			
	III. Pré-athérome	Cellules spumeuses très nombreuses et apparition de lipides extracellulaires			
Lésions avancées	IV. Athérome	Core lipidique (accumulation dense de lipides extracellulaires et cristaux de cholestérol) sans fibrose		Après 20 ans	Symptomatique
	V. Fibrolipidique (Va) Vb. +calcifications Vc. Cœur lipidique très réduit ou absent	Core lipidique (accumulation de cellules spumeuses d'origine principalement macrophagique et de CML) et chape fibreuse (CML et MEC)		Après 20 ans Majorité des individus après 40 ans	
	VI. Fibro-athérome compliqué VIa. Ulcération VIb. Hémorragie intraplaque VIc. Thrombose	Conséquence d'une érosion ou une rupture de plaque			
	VII. Lésion calcifiée	Nouvelle appellation de la lésion Vb			
	VIII. Lésion fibreuse	Nouvelle appellation de la lésion Vc			

1.1.2.3. Phénotype de la plaque

La plaque d'athérosclérose va évoluer de façon progressive pendant plusieurs années sans altérer le calibre du vaisseau. Les manifestations cliniques de l'athérosclérose sont en rapport avec la stabilité de la plaque qui est en lien avec le risque thrombotique (Mann and Davies 1996). Ainsi, 2 phénotypes de plaque ont été décrits :

La plaque vulnérable ou instable c'est-à-dire la plaque susceptible de se rompre et d'entraîner des complications thrombotiques ou emboliques (Ambrose and Srikanth 2010). Ces plaques présentent des cœurs lipidiques volumineux et une chape fibreuse fine (Virmani, Burke et al. 2002). La rupture totale de la plaque, ou son érosion, mettra en contact le flux sanguin avec le contenu fortement thrombogène du cœur lipido-nécrotique de la plaque. Cet évènement aboutira à une occlusion totale ou partielle du vaisseau qui, *via* des processus de cicatrisation, participera au développement de la plaque, ou à un morcellement du thrombus qui peut ensuite migrer vers un autre territoire artériel.

La plaque stable ou fibreuse qui présente un cœur lipidique restreint et une épaisse chape fibreuse. La matrice extra cellulaire (MEC) de ce type de plaque est dense, peu de cellules immunitaires y sont infiltrées et la population en CML est importante (Libby and Aikawa 2002).

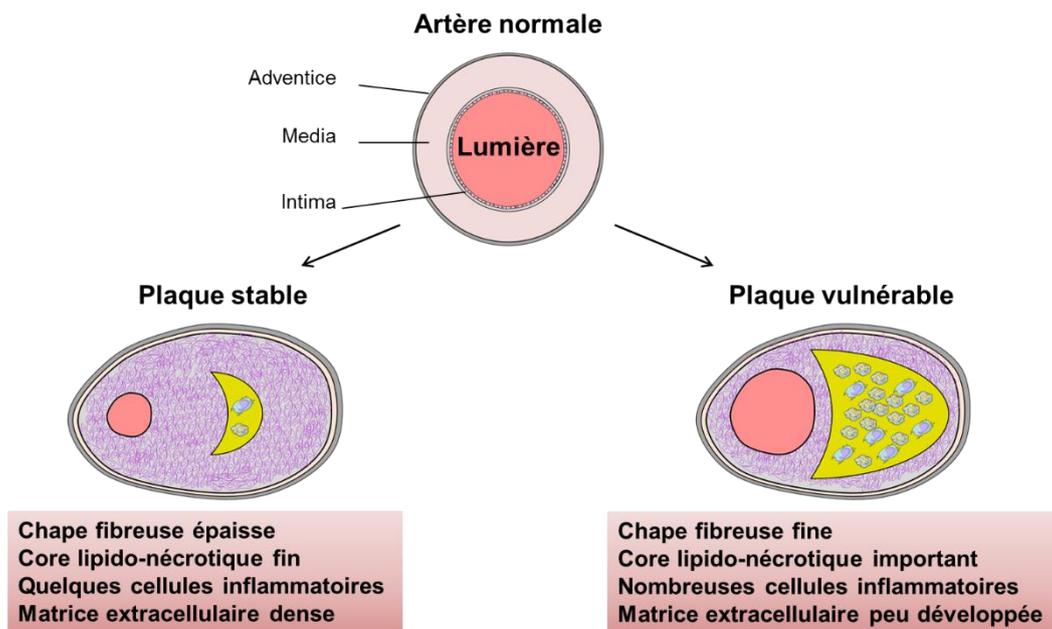


Figure 4 : Représentation schématique des phénotypes stables ou vulnérables des plaques d'athérosclérose (Libby and Aikawa 2002)

1.1.2.4. Données historiques

Plusieurs théories ont tenté d'expliquer la survenue des plaques d'athérosclérose. En 1852, Rokitansky supposait que les plaques résultaient du dépôt de fibrine. Cette hypothèse soulevait déjà l'implication des processus pro-thrombotiques dans l'athérosclérose.

A partir de 1913, Anitschkov and Chalатов, ont montré l'implication du cholestérol dans le développement de l'athérosclérose. Ces travaux étayaient ainsi la théorie lipidique de la survenue des plaques en émettant l'hypothèse d'une accumulation progressive de lipides dans la paroi artérielle (Konstantinov, Mejevoi et al. 2006).

D'autres théories, comme la théorie tumorale explorait l'hypothèse que les CML des plaques subissaient des altérations du cycle cellulaire, comme observé lors de la tumorigenèse et ainsi chaque lésion athéroscléreuse serait un néoplasme bénin (Schwartz and Murry 1998). La théorie de l'infection met en cause certaines bactéries (*Chlamydia pneumoniae* ou *Helicobacter pylori*) ainsi que certains virus

(Herpesvirus, VIH ou cytomegalovirus) dans l'athérosclérose, les événements coronaires ou encore les resténoses (Libby, Egan et al. 1997), (Belland, Ouellette et al. 2004), (Fudal, Domal-Kwiatkowska et al. 2010),. Néanmoins, il reste à déterminer si ces infections peuvent être des causes ou des facteurs aggravants de la pathologie.

Rudolph Virchow en 1856 avait déjà posé les bases des théories actuelles de l'athérosclérose en décrivant la théorie inflammatoire fondée sur l'observation des modifications structurelles de l'intima (augmentation de tissu conjonctif, calcification, imprégnation graisseuse). Ross et Glomset en 1976 ont remis en avant cette théorie. Il est maintenant admis et démontré que l'inflammation est impliquée dans l'athérosclérose dès le stade d'initiation en réponse à une agression externe. Au cours de l'évolution de la lésion, les processus inflammatoires participent aux complications de la plaque comme la calcification ou la stabilité/instabilité de la plaque, responsable notamment des complications thrombotiques (Tedgui and Mallat 2001).

L'ensemble de ces théories souligne l'aspect multifactoriel de l'athérosclérose. Ces facteurs peuvent être d'origine génétique, biochimique, ou environnementale.

1.1.2.5 Connaissances actuelles

Le but de ce paragraphe est de présenter les événements cellulaires et moléculaires mis en jeu dans l'athérosclérose et son développement. Nous soulignerons ensuite l'implication spécifique des macrophages dans ces processus.

Lors de la phase initiale du développement de l'athérosclérose, l'endothélium ne joue plus son rôle de barrière et peut laisser s'infiltrer des produits du sang dans l'espace sous endothélial, on parle alors de dysfonction endothéliale. Cette première étape mène à l'état inflammatoire initiant l'athérosclérose. Ainsi, lorsque les forces de frottement du flux sanguin sont constantes, l'endothélium forme une couche semi-perméable entre la circulation sanguine et la paroi du vaisseau et présente des

propriétés anti-inflammatoires et anti-thrombotiques. Les mécanismes de mécanotransduction permettent une réponse adaptative des cellules endothéliales aux variations du flux sanguin par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de NO. Outre la relaxation des CML et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, le NO induit la prolifération des cellules endothéliales pour réparer les blessures de l'endothélium et élimine les ROS, néfastes pour l'intégrité de l'endothélium (Hsieh, Liu et al. 2014).

Les lipoprotéines peuvent traverser la paroi des vaisseaux sanguins pour interagir avec des éléments cellulaires. Lors de cette migration, les LDL peuvent alors se fixer aux protéoglycanes de l'intima des artères *via* l'apolipoprotéine B. Dans les zones de l'arbre circulatoire comme les courbures ou les bifurcations artérielles, les forces de frottements sont altérées (Berliner, Navab et al. 1995). La balance entre la production de ROS et de NO par les cellules endothéliales est alors modifiée. Les ROS en proportion plus importante oxydent l'apolipoprotéine B. L'accumulation de ces formes oxydées des LDL au sein de l'intima favorisera alors la dysfonction endothéliale et le passage de nouvelles molécules dont d'autres LDL qui seront à leur tour oxydées (Napoli 1997). Ces formes oxydées de LDL activent l'adhérence et le recrutement des cellules immunitaires.

L'adhérence des leucocytes est un des événements précoces de l'athérogenèse. Dans un premier temps, ces lipoprotéines oxydées induiront l'expression de molécules d'adhérence au niveau des cellules endothéliales et des leucocytes (Takei, Huang et al. 2001). Des molécules comme les sélectines, les intégrines et les immunoglobulines joueront un rôle prépondérant dans ce processus de recrutement en permettant le ralentissement, le roulement et l'extravasation des cellules leucocytaires. Les intégrines bêta 1 et bêta 2 et les molécules d'adhérence telles que VCAM1 ou l'intercellular adhesion molecule (ICAM1), permettent l'attachement des leucocytes à l'endothélium et l'extravasation dans la paroi artérielle (Babaev 2007). D'autres protéines permettent ensuite le recrutement des cellules immunitaires. Le monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) permet l'infiltration des monocytes *via* des mécanismes de diapédèse et transmigration du sang vers l'intima où ils se différencient en macrophages sous l'action du macrophage colony-forming factor (MCSF). Ce phénomène est ensuite entretenu par les macrophages et les CML dans

la plaque *via* la synthèse de facteurs chimiotactiques tels que le MCP-1 ou l'IL-8 (Libby 2002). Dans les plaques d'athérosclérose, les monocytes/macrophages ont la capacité de proliférer notamment sous l'influence du MCSF produit en premier lieu par les cellules endothéliales puis les CML et enfin par les macrophages eux-mêmes (Aikawa, Rabkin et al. 2001).

Le rôle des monocytes qui ont ainsi pénétré dans la paroi artérielle est d'éliminer les formes modifiées de LDL. Grâce à leur différenciation en macrophages, ils acquièrent la capacité d'internaliser les LDL oxydées *via* les récepteurs éboueurs SR-A et CD36 (Steinberg 2002). Ces récepteurs n'étant pas soumis à la régulation par le contenu intracellulaire en cholestérol, les macrophages pourront capter de grandes quantités de LDL oxydées. Leurs capacités de dégradation des lipides et d'efflux du cholestérol étant ensuite dépassées, les macrophages se transformeront en cellules spumeuses qui s'accumulent dans la paroi constituant alors les stries lipidiques (Libby, Aikawa et al. 2000).

En plus des macrophages, il a été démontré que les CML sont également capables de capter les LDL modifiées et de se surcharger en lipides pour former des cellules spumeuses (Sary, Chandler et al. 1994, Lacolley, Regnault et al. 2012). Dans les stades avancés de la plaque, les lipides ne sont plus uniquement intracellulaires, contenus dans les cellules spumeuses, mais sont retrouvés également libres au centre de la plaque, formant un amas appelé cœur lipidique qui est constitué de cholestérol, d'esters de cholestérol et de débris cellulaires (Libby 2002).

Une fois infiltrés dans les lésions, les macrophages synthétisent et secrètent un grand nombre de cytokines pro inflammatoires comme le $TNF\alpha$, l'IL-1 β , l'IL-6 ou l'IL-12, qui favorisent le recrutement d'autres leucocytes et entretiennent la réponse inflammatoire locale. En plus des effets sur la croissance de la plaque, ces cytokines jouent un rôle important dans sa fragilisation (Tedgui and Mallat 2006).

Les processus apoptotiques sont prépondérants dans la formation du noyau lipidique ou nécrotique dont la taille sera proportionnelle au risque de rupture de la plaque. L'apoptose est un événement biologique retrouvé aussi bien dans les prémices de l'athérosclérose que dans les plaques aux stades les plus avancés (Bjorkerud and

Bjorkerud 1996). L'apoptose des cellules endothéliales entraîne l'érosion de l'endothélium, promouvant la formation de pro-thrombi en lien avec les propriétés pro-adhésives et pro-coagulantes des cellules endothéliales en apoptose (Sugiyama, Kugiyama et al. 2004). L'apoptose des CML a été mise en évidence dans les plaques avancées au sein notamment des zones d'épaulement, suggérant un rôle possible de ce phénomène dans la rupture de la plaque (Geng and Libby 1995, Isner, Kearney et al. 1995). En effet, l'apoptose des CML entraîne le relargage de cytokines comme l'IL-8, l'IL-1 ou le MCP1 induisant le recrutement de monocytes. Les débris cellulaires engendrés par l'apoptose des CML peuvent également donner lieu à la génération de thrombine, la calcification ou le remodelage négatif (Littlewood and Bennett 2003), (Mallat, Benamer et al. 2000), (Schaub, Liles et al. 2003).

L'apoptose des macrophages est également retrouvée dans les stades précoces et avancés de la pathologie athéroscléreuse avec des rôles antinomiques. Dans les stades précoces, l'efférocytose (processus de phagocytose des cellules apoptotiques) des macrophages apoptotiques est efficace et permet la suppression de la réponse inflammatoire ainsi que la diminution de la cellularité des lésions et donc de leur taille (Seimon and Tabas 2009). Dans les lésions avancées, ce mécanisme est pris à défaut, les macrophages en apoptose s'accumulent, subissent une nécrose secondaire post-apoptotique, provoquant l'accroissement du centre nécrotique (Ball, Stowers et al. 1995).

Les CML prolifératives et synthétiques d'une part et les CML quiescentes contractiles d'autre part constituent les 2 bornes d'un continuum de phénotypes que peuvent acquérir les CML (Lacolley, Regnault et al. 2012). Récemment des travaux ont montré que des cellules exprimant le CD68 étaient dérivées de CML et, à l'inverse, des cellules positives pour l'alpha smooth muscle actin (α SMA) ne provenaient pas de CML ((Albarran-Juarez, Kaur et al. 2016, Allahverdian, Chehroudi et al. 2014). La prolifération des CML est un autre élément important de la constitution de la plaque d'athérosclérose. Au sein des artères normales, les CML ont un indice de prolifération très bas. Une augmentation de la prolifération est néanmoins observée durant les phases précoces de l'athérogenèse ainsi qu'en réponse à une lésion vasculaire (Bennett, Sinha et al. 2016), (Lutgens, de Muinck et al. 1999). La leptine favorise la prolifération *via* les voies JAK2, ERK et NFkB et la migration de ces

cellules *via* la voie PI3K dans des CMLV de rat (Oda, Taniguchi et al. 2001), (Li, Mamputu et al. 2005). La leptine peut également induire une hypertrophie des CML *via* ERK1/2, la voie de l'angiotensine et de l'endothéline (Zeidan, Purdham et al. 2005). De plus, des souris déficientes pour la leptine ou son récepteur présentent moins de prolifération des CML et moins de lésions que les souris sauvages (Schafer, Halle et al. 2004). A l'inverse, d'autres molécules modulent les facultés prolifératives des CML. Par exemple, les CML traitées par les rétinoïdes, et plus particulièrement l'isoforme *tout trans*, ont une prolifération diminuée par rapport aux cellules non traitées, cet effet étant médié par l'isoforme alpha du Retinoic acid receptor (RAR α) (Neuville, Yan et al. 1999, Miano, Topouzis et al. 1996).

Les macrophages peuvent également promouvoir l'activation des CML. *In vitro*, des expériences de co-culture ont montré que le platelet derived growth factor (PDGF) secrété par les macrophages augmente la croissance des CML (Morizaki 1992). Ainsi, la production de PDGF par ces cellules infiltrées amplifie également la migration des CML qui vont produire alors de la matrice extracellulaire (fibrinogène, collagène, élastine, protéoglycanes) consolidant la chape fibreuse autour du cœur lipidique et stabilisant alors la plaque (Lusis 2000). En regard de cette production de MEC, les macrophages participent à la dégradation de la MEC en produisant des métalloprotéinases matricielles (MMP), facilitant la migration des CML de la média vers l'intima et y proliférer en provoquant un épaississement de la paroi (Newby 2007). La chape fibreuse a pour but principal d'isoler le cœur lipidique/nécrotique de la plaque du flux sanguin (Raines and Ferri 2005). Il est connu que la chape fibreuse est plus fine au niveau de l'épaule, ce qui en fait une partie vulnérable de la plaque (Falke, Matzsch et al. 1995).

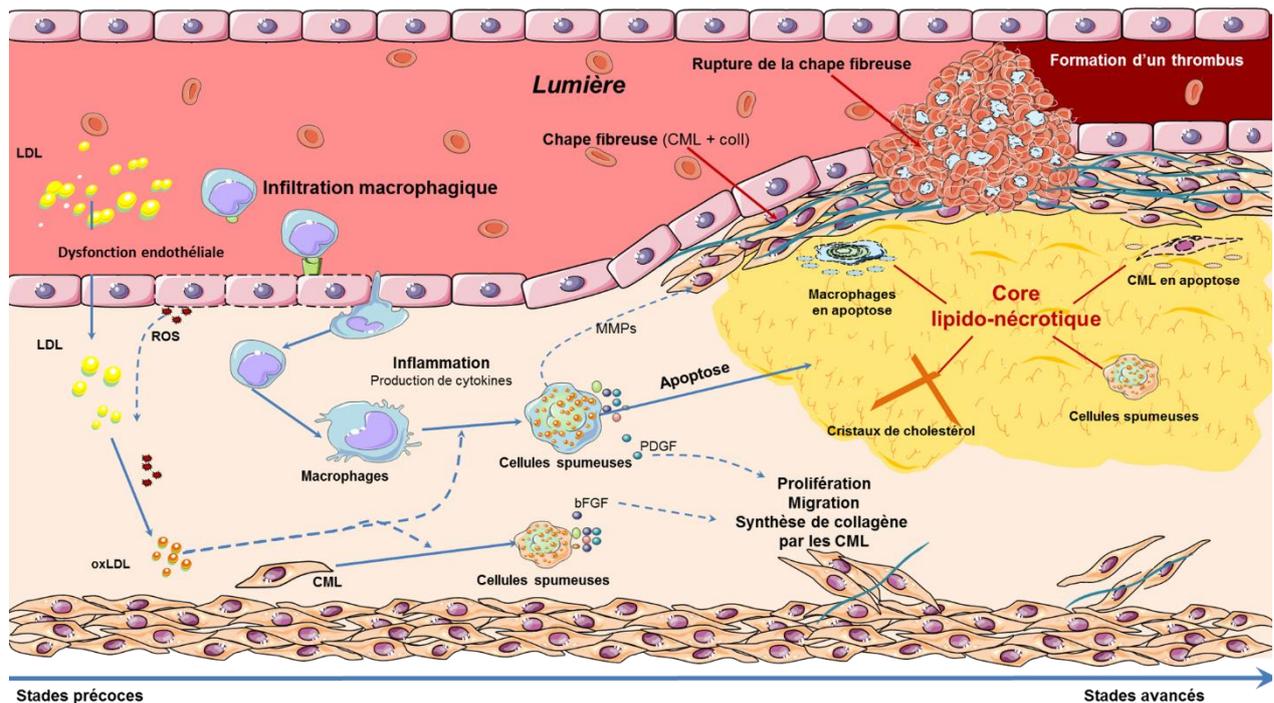


Figure 5 : Schéma de la physiopathologie de la plaque d'athérome.

Le passage des LDL dans l'espace sous endothélial de l'intima mène à l'oxydation de ces lipoprotéines. Les monocytes sanguins adhèrent à l'endothélium et s'infiltrent pour prendre en charge ces oxLDL. Les macrophages se transforment en cellules spumeuses dont l'accumulation formera le core lipidique. Les cytokines produites par les macrophages et les cellules spumeuses entraîneront la prolifération, la migration et la synthèse de collagène par les CML formant ensuite la chape fibreuse isolant le core nécrotique de l'endothélium. La rupture de cette chape mène à la formation d'un thrombus responsable des événements cardiovasculaires aigus

1.1.2.5 Traitements de l'athérosclérose

Outre les mesures hygiéno-diététiques permettant de diminuer la survenue d'évènements cardiovasculaires, des traitements pharmacologiques et chirurgicaux existent.

Traitements pharmacologiques

Il est aujourd'hui possible de prévenir les processus impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose :

- Inhibition de la synthèse de cholestérol : les statines, *via* l'inhibition de l'hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) permettent de diminuer les taux de cholestérol circulant, donc de diminuer le contenu lipidique des plaques. La réponse inflammatoire sera donc moins importante et les plaques seront moins à risque d'ulcération ou de fragilisation.
- Inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol : l'ézétimibe, en bloquant le transporteur de stérols Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), inhibe les apports au foie du cholestérol intestinal.
- Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine : les inhibiteurs de l'enzyme de conversion amélioreront la pression artérielle en diminuant la synthèse de l'angiotensine 2, un peptide vasoconstricteur.
- Inhibition de la formation du thrombus : les antiplaquettaires et les anticoagulants sont prescrits afin de prévenir le risque de thrombose.

Si ces traitements médicamenteux permettent de prévenir les complications athéroscléreuses dans les cas de pathologies athéroscléreuses comme les anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) ou la SVA ils ne permettent pas d'agir sur l'histoire naturelle de la pathologie ni de modifier la lésion anatomique. La meilleure compréhension des processus complexes impliqués dans ces pathologies doit permettre à terme de découvrir des cibles thérapeutiques spécifiques et innovantes.

Traitements chirurgicaux

- Pontage aorto-coronarien

Lorsque le traitement médicamenteux des lésions athéroscléreuses coronariennes est insuffisant pour réduire les symptômes de l'insuffisance coronaire, le pontage aorto-coronarien constitue alors le traitement chirurgical de choix. Cette technique chirurgicale consiste à contourner l'artère coronaire obstruée en effectuant une

dérivation avec un greffon veineux ou artériel implanté en aval et amont de la partie sténosée. Cette technique de pontage peut également être appliquée dans le cas des AOMI en effectuant un pontage fémoro-poplitée ou aorto-bi-fémoral en fonction de la localisation des plaques.

- Exérèse chirurgicale

Cette opération consiste à enlever la plaque d'athérome empêchant la bonne circulation sanguine. Cette intervention, appelée endartériectomie, concerne les plaques touchant le plus souvent la bifurcation carotidienne ou l'artère fémorale. L'exérèse chirurgicale peut aussi être appliquée dans les cas de SVA, auquel cas la valve aortique sera remplacée par une bioprothèse ou une prothèse mécanique. Enfin dans le cas des AAA, le remplacement de la portion d'aorte lésée est appelé pontage aorto-aortique ou pontage aorto-bi-iliaque en fonction de la localisation de l'anévrisme. Ces opérations chirurgicales visent à préserver le flux sanguin en restaurant l'intégrité de l'arbre artériel.

- Traitements endovasculaires

L'angioplastie est une technique qui consiste à réparer le vaisseau pour restaurer son bon fonctionnement en éliminant la plaque d'athérome au niveau du rétrécissement ou de l'occlusion. Au cours de cette intervention, la plaque d'athérome est écrasée contre la paroi et l'artère est ré-ouverte. La dilatation par ballonnet peut être associée à la pose d'un stent permettant de stabiliser la dilatation du vaisseau. Ces stents peuvent être coatés par des antimitotiques pour prévenir la resténose.

Cette approche endovasculaire permet également la pose d'endoprothèses uni-iliaques ou bifurquées, renforcées d'un stent (traitement des AAA) mais également la pose de bioprothèses valvulaires par implantation transcathéter (TAVI) (traitement de la SVA).

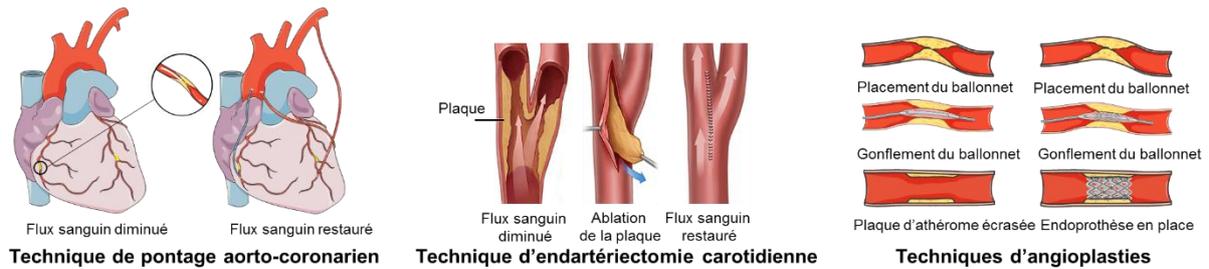


Figure 6 : Traitements chirurgicaux de l'athérosclérose

I.1.3 Polarisation des monocytes/macrophages

Les monocytes circulants représentent environ 10% des leucocytes présents dans la circulation sanguine chez l'Homme. Ces cellules vont ensuite migrer dans les tissus par diapédèse et se différencier en macrophages, des cellules phagocytaires. En fonction du tissu cible, les macrophages présenteront des morphologies et des capacités différentes. Dans le foie, ces macrophages donneront lieu aux cellules de Kupffer ((Haubrich 2004), dans les poumons, les macrophages alvéolaires (Lambrecht 2006), les cellules microgliales dans le cerveau (Aloisi 2001), les cellules de Langherans dans l'épiderme (Merad, Romani et al. 2008), les macrophages spléniques dans la rate (Mebius and Kraal 2005) ou les ostéoclastes dans le tissu osseux (Quinn and Gillespie 2005).

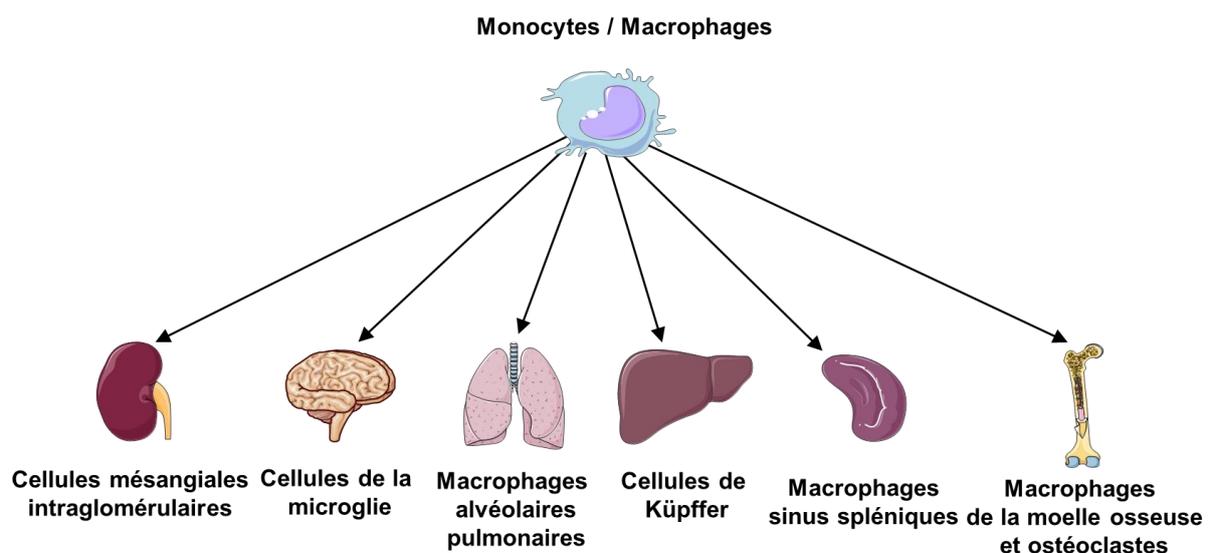


Figure 7 : Types de macrophages en fonction de leur tissu cible

Les macrophages sont donc des cellules plastiques, capables d'acquérir différents phénotypes fonctionnels sous l'action de divers stimuli de leur microenvironnement (Gautier and Yvan-Charvet 2014). L'étude de leurs marqueurs de surface, des cytokines exprimées et des fonctions biologiques permet de décrire plusieurs sous familles de macrophages (Colin, Chinetti-Gbaguidi et al. 2014),(Chinetti-Gbaguidi, Colin et al. 2015).

- Macrophages M1

Les cytokines de type Th1 ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IFN\gamma$) ainsi que le lipopolysaccharide (LPS) induisent un phénotype macrophagique dit « classique », ou M1 décrit comme pro-inflammatoire. Ces macrophages sont capables de lutter contre les microorganismes en produisant des cytokines pro-inflammatoires comme le $TNF\alpha$, l' $IL-6$, l' $IL-1\beta$, l' $IL-12$ ou encore l' $IL-23$ et *via* la production de ROS (Verreck, de Boer et al. 2004). Au cours du développement de la plaque d'athérosclérose, les M1 sont induits par les lipides oxydés (Düwell, Kono et al. 2010) et participent à la formation du core nécrotique et à la déstabilisation de la plaque (Butcher and Galkina 2012).

- Macrophages M2

Un phénotype macrophagique « alternatif » appelé M2 permet de contrôler l'inflammation. Cette population, a été mise en évidence *in vitro* en 1992 après stimulation par l' $IL-4$, menant à la surexpression du récepteur au mannose (MR, MRC1 ou CD206). En fonction des signaux inducteurs, quatre sous types de M2 sont décrits (M2a, b, c et d).

Ces macrophages de type M2 seront capables de résoudre l'inflammation en phagocytant les M1 en apoptose. Les M2 participent également à la synthèse de MEC ce qui fait du macrophage un acteur du remodelage tissulaire mais également de l'angiogenèse rencontrée dans les lésions athéroscléreuses (Gratchev, Schledzewski et al. 2001).

- Macrophages Mø1 et Mø2

Sous l'action du granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), ou M-CSF, les monocytes se différencient en macrophages de type Mø1 et Mø2 respectivement. Ces cellules présentent alors des propriétés équivalentes aux macrophages M1 et M2 (Verreck, de Boer et al. 2004).

Ces multiples phénotypes observés *in vitro* soulignent l'hétérogénéité, la plasticité, et l'adaptabilité des macrophages. Néanmoins, la question de la relevance physiologique et physiopathologique de ces phénotypes peut se poser. Ainsi, plusieurs études ont exploré les populations macrophagiques *in vivo* afin de nuancer la dichotomie M1-M2 conventionnelle reflétant mal la complexité des phénotypes des macrophages, notamment dans la plaque d'athérosclérose. En fonction de la zone de la plaque étudiée, plusieurs phénotypes vont cohabiter :

- Macrophages Mox

La polarisation de ces macrophages est médiée par le facteur de transcription Nrf2 sous l'induction de phospholipides oxydés. Le nom de ce phénotype vient du pouvoir antioxydant important de ces cellules (Kadl, Meher et al. 2010). Ce phénotype macrophagique peut représenter jusqu'à 30% des macrophages infiltrés dans les plaques chez la souris mais ils n'ont pas été décrits chez l'Homme. *In vitro*, les Mox peuvent être induits à partir des macrophages M1 ou M2, soulignant encore la plasticité des macrophages.

- Macrophages M(Hb) et Mhem

Ces macrophages sont présents dans les plaques athéroscléreuses humaines dans les zones hémorragiques et sont induits par le complexe hémoglobine/haptoglobine (Hb/Hp) ou par l'hème (Finn, Nakano et al. 2012), (Boyle 2012). Les macrophages M(Hb) expriment le MR et le CD163, récepteur du complexe Hb/Hp. De plus, ces macrophages sont protégés vis-à-vis de l'accumulation de lipides par l'expression de transporteurs impliqués dans l'efflux du cholestérol. Des macrophages CD68+/MR+ sont présents dans les zones de néovascularisation (Bories, Colin et al. 2013). Ces

cellules présentent des capacités phagocytaires importantes pour les érythrocytes sénescents et les cellules en apoptose, avec la particularité supplémentaire de capter et d'accumuler le fer *in vitro* ((Chinetti-Gbaguidi, Bouhlel et al. 2012), (Bories, Colin et al. 2013). Les Mhem quant à eux expriment l'hmox 1, une protéine impliquée dans le catabolisme de l'hème et participent à l'élimination des érythrocytes sénescents. Ces deux types de macrophages pourraient donc avoir un rôle athéroprotecteur en résistant à l'accumulation des lipides et donc à leur dégénérescence en cellules spumeuses et en endiguant les dommages provoqués par la présence de fer et d'érythrocytes dans la plaque.

- Macrophages M4

Ce phénotype a été décrit chez l'homme plus récemment (Gleissner 2012). Ces M4 acquièrent leur phénotype après stimulation par le CXCL4 (également appelé Platelet Factor 4 ou PF4). Cette chimiokine pro-coagulante et chemoattractante retrouvée dans les granules alpha des plaquettes activées est également fortement exprimée par l'endothélium des plaques d'athérosclérose et par les macrophages eux-mêmes (Pitsilos, Hunt et al. 2003), (Gleissner 2012). Les macrophages de type M4 présentent un profil cytokinique identique aux M1 mais n'ont pas d'activité phagocytaire et n'expriment pas le CD163 (Gleissner, Shaked et al. 2010). Plus récemment, il a été montré que ces M4 (décrits comme MMP7+/S100A8) sont retrouvés dans les plaques instables (Erbel, Wolf et al. 2015).

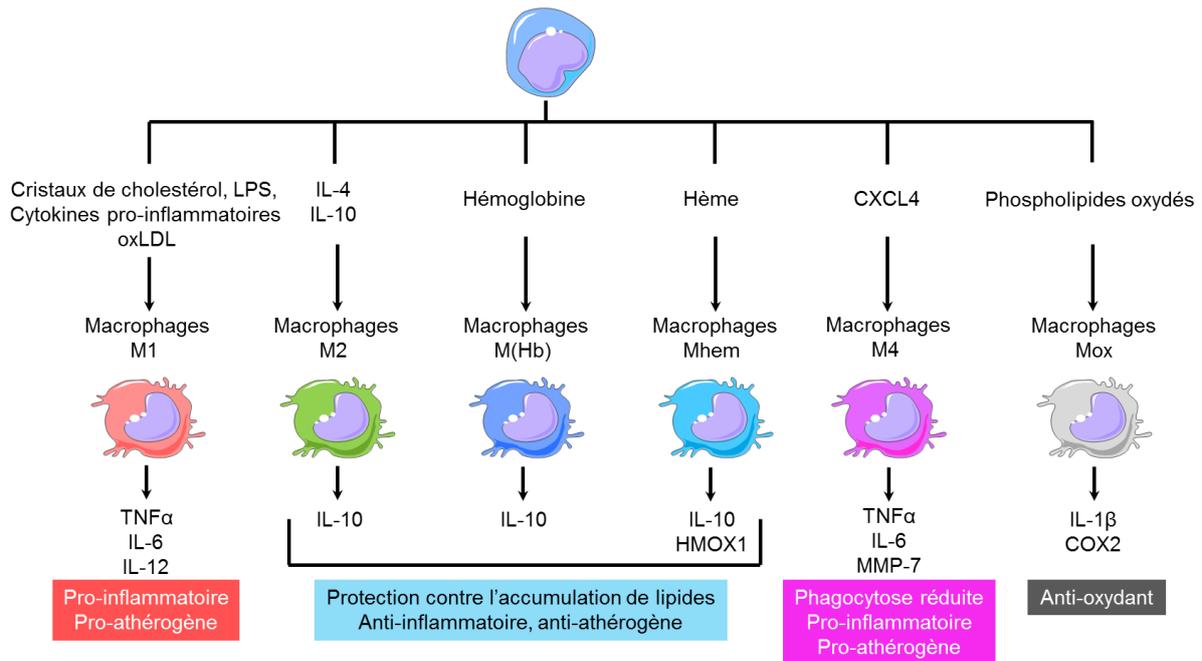


Figure 8 : Diversité des macrophages : Principaux sous-types de macrophages des lésions athéroscléreuses humaines. (d'après Chinetti-Gbaguidi et al, 2015)

En marge de cette nomenclature basée sur les profils membranaires et sécrétoires, Mosser et al ont proposé une classification basée sur les propriétés fonctionnelles des cellules. Ainsi, cette équipe distingue trois grands groupes de macrophages : Les macrophages activés classiquement (correspondant aux M1), les macrophages régulateurs (regroupant les phénotypes M2b et M2c) et les macrophages réparateurs (M2a) (Mosser and Zhang 2008).

- Répartition des sous types de macrophages au sein de la plaque

Plus la lésion est avancée, plus le nombre de macrophages retrouvés au sein de la plaque est important (Cho, Miyoshi et al. 2013). Il est maintenant clairement établi que les macrophages de type M1 et M2 ne se localisent pas dans les mêmes zones de la plaque, soulignant des rôles distincts de ces deux phénotypes dans la physiopathologie de la formation de la plaque, mais également certainement dans la stabilité de la plaque. De par leur profil d'expression de protéines proinflammatoires et impliquées dans le remodelage de la MEC, les macrophages de type M1 seront préférentiellement retrouvés au sein du cœur lipido-nécrotique. Dans la chape fibreuse, les phénotypes M1 et M2 sont retrouvés en proportion équivalente. Cette

dualité suggère que les M1 participeraient à la dégradation et déstabilisation de la plaque alors qu'à l'inverse, les M2 joueraient un rôle bénéfique profibrotique et stabilisant. Au niveau de l'adventice, les M2 sont présents en plus grande proportion par rapport aux M1 (Chinetti-Gbaguidi, Copin et al. 2015). Cette différence de proportion pourrait favoriser le recrutement de leucocytes en augmentant la néovascularisation, cette hypothèse allant à l'encontre du rôle anti-inflammatoire de cette sous-population. Une autre explication serait que, comme montré dans le tissu adipeux, ces macrophages pourraient subir un changement phénotypique local précédant le développement de la pathologie (Stoger, Gijbels et al. 2012).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences de localisation dans la plaque. Les différents types de macrophages pourraient être issus de différents types de monocytes, la physiopathologie du développement de la plaque pourrait induire un décalage temporel et spatial dans le recrutement des différents types de macrophages M1 et M2 et enfin les macrophages pourraient subir des changements phénotypiques en fonction des stimuli de leur microenvironnement. Cette troisième hypothèse est étayée par le fait que la présence de marqueurs M1 diminue au profit de marqueurs M2 dans un modèle animal de régression de la lésion (Feig and Feig 2012).

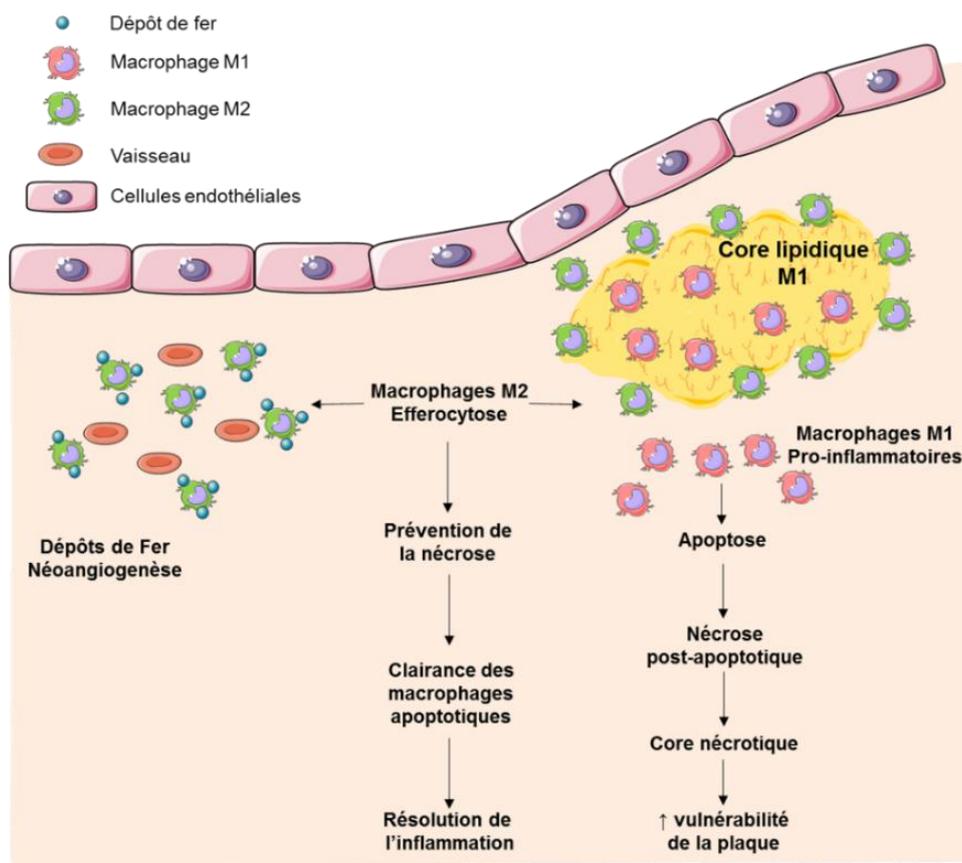


Figure 9 : Macrophages M2 dans les zones spécifiques des lésions d'athérosclérose, rôle dans l'efférocytose (D'après Chinetti-Gbaguidi et al 2015)

- Macrophages et stabilité de la plaque

Dans les plaques carotidiennes instables, la majorité des macrophages retrouvés est de type M1. Les macrophages de type M2 sont plus présents dans les zones les plus stables des lésions coronaires alors que les marqueurs et les cytokines de type Th1 sont plus exprimés dans les plaques symptomatiques de patients coronariens (de Gaetano, Crean et al. 2016). De la même façon, les lésions athéroscléreuses coronariennes chez des patients ayant présenté un IDM sont riches en macrophages M1 (Lee, Chung et al. 2013). Chez des patients subissant une endartériectomie carotidienne, la vulnérabilité de la plaque était plus importante chez les patients symptomatiques qui présentent une plus grande part de M1 au sein des plaques avec une expression accrue de MCP-1, IL-6 et MMP-9 (Cho, Miyoshi et al. 2013). Ces données suggèrent que l'instabilité de la plaque peut être la conséquence d'un déséquilibre entre le phénotype M1 et M2.

I.2 Sténose Valvulaire Aortique

I.2.1. Généralités

La sténose valvulaire aortique (SVA) est la troisième pathologie cardiaque la plus fréquente derrière la maladie coronarienne et l'hypertension. La valve aortique, normalement constituée de 3 cuspides (ou valvules ou sigmoïdes) permet de réguler l'éjection du sang du ventricule gauche vers l'aorte.

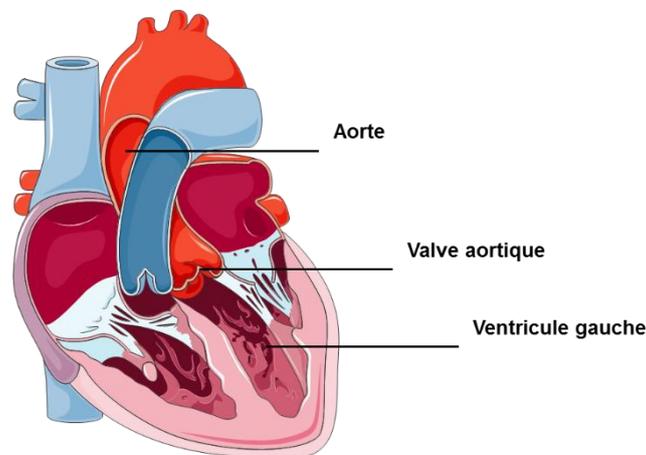


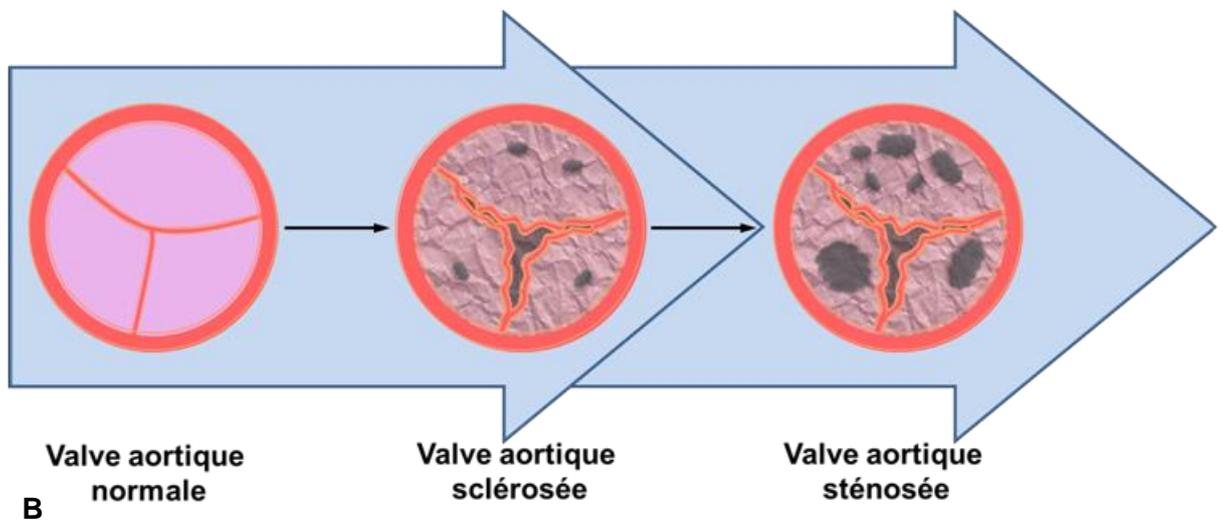
Figure 10 : Situation anatomique de la valve aortique

I.2.1.1 Définition

Affectant 2 à 6% des personnes âgées de plus de 65 ans, la SVA est la pathologie valvulaire la plus fréquente en Europe (lung and Vahanian 2014). La SVA correspond à la phase symptomatique de la dégénérescence fibro-calcique de la valve aortique. La phase asymptomatique dite de sclérose aortique débute par un épaissement modéré des feuillets histologiques constituant la valve aortique (la fibrosa riche en collagène, la spongiosa composée de protéoglycanes et la ventricularis au versant ventriculaire formée de fibres d'élastine). Le principal constituant cellulaire de la valve aortique est la Valvular Interstitial Cell (VIC). Ce sont des cellules définies négativement n'exprimant pas de marqueur macrophagique ni de marqueur de cellules endothéliales, en grande partie responsables de l'homéostasie tissulaire et qui présentent d'importantes capacités de différenciation

(Chen, Yip et al. 2009). Elles peuvent, entre autre, se différencier en cellules calcifiantes de type ostéoblastique *in vitro* mais également *in vivo* sous l'effet de stimuli mécaniques par exemple (Xing, Warnock et al. 2004), (Wyss, Yip et al. 2012), (Li, Xu et al. 2013). Les VIC sont également capables de sécréter de nombreux médiateurs (cytokines, facteurs de croissance, métalloprotéinases...) et participent au remodelage de la MEC aboutissant à la formation de tissu fibrotique (Li, Xu et al. 2013).

A



B



Figure 11 : Evolution de la SVA. A) Continuum schématique de la pathologie de la valve normale à la sténose aortique. (d'après (Rajamannan, Evans et al. 2011), 2011). B) Photographies de valves aortiques: normale, bicuspidie calcifiée, tricuspide calcifiée.

Initialement décrite comme un vieillissement passif de la valve aortique, la SVA est aujourd'hui considérée comme un phénomène actif donc les aspects physiopathologiques l'assimilent à l'athérosclérose. Des travaux récents ont montré

que la SVA et l'athérosclérose présentaient des facteurs de risque similaires, notamment l'âge et l'accumulation de tissu adipeux blanc viscéral (Katz, Wong et al. 2006). Cette accumulation est corrélée à une prévalence augmentée et une progression plus rapide de la maladie, accompagnée d'une dégénérescence accrue des bioprothèses vasculaires et cardiaques (Page, Dumesnil et al. 2010). Parmi les facteurs de risque spécifiques de la SVA la morphologie de la valve est un facteur important. Les patients atteints de bicuspidie congénitale (forme la plus fréquente de malformation cardiaque, présente chez 1 à 2% de la population) sont significativement plus atteints par des pathologies aortiques que les patients avec des valves tricuspides (Ait-Ali, Foffa et al. 2012).

1.2.1.2. Epidémiologie

La SVA est la conséquence du remodelage fibrocalcique de la valve aortique. La sclérose aortique est la phase asymptomatique précédant la SVA. Elle est définie comme un épaissement de la valve avec présence de calcifications, mais sans retentissement sur le flux sanguin (Nishimura, Otto et al. 2014). La prévalence de la sclérose aortique augmente progressivement avec l'âge. Dans les pays industrialisés, près de 25% des personnes âgées de plus de 65 ans présenteraient une sclérose aortique, ce chiffre allant jusqu'à 50% chez les sujets de plus de 85 ans (Thompson, Nelson et al. 1997), (Coffey, Cox et al. 2014). La prévalence de la SVA est très inférieure à celle de la sclérose aortique et est estimée à 2% à 6% des personnes âgées de plus de 65 ans (Nkomo, Gardin et al. 2006). Le nombre de patients atteints par la SVA pourrait encore s'accroître avec le vieillissement de la population et l'absence de traitement thérapeutique. Certaines estimations annoncent que le nombre de sujets atteints sera multiplié par 2 à 3 d'ici 50 ans dans les pays industrialisés (Danielsen, Aspelund et al. 2014), (Osnabrugge, Mylotte et al. 2013), (lung and Vahanian 2012).

Dans les pays en voie de développement, le remodelage valvulaire est plus souvent dû aux cardiopathies rhumatismales. L'infection par des streptocoques peut conduire à une fièvre rhumatismale chronique menant à une cardiopathie. Dans cette pathologie, les feuillets des valves cardiaques peuvent fusionner au niveau des

commissures causant un obstacle au flux sanguin et donc une SVA souvent accompagnée d'une atteinte de la valve mitrale (Sliwa, Carrington et al. 2010).

1.2.1.3. Facteurs de risque

La SVA partage de nombreux facteurs de risque avec les autres pathologies cardiovasculaires athéroscléreuses. Néanmoins, cette pathologie présente certains facteurs de risque distincts.

Les deux principaux facteurs de risque de la SVA sont l'âge et la malformation des feuillets de la valve. Les valves bicuspidés ont 2 cuspidés fonctionnelles généralement de taille inégale résultant d'une séparation incomplète des commissures durant le développement embryonnaire. Les individus présentant une valve bicuspidée verront le développement physiopathologique de la SVA s'exprimer 10 à 20 ans plus tôt par rapport à des patients avec une valve tricuspide. Il existe 3 formes de bicuspidie : fusion des cuspidés coronaires droites et gauches (retrouvées chez 60% des patients), fusion de la cuspidé coronaire gauche avec la cuspidé non coronaire (35% des patients) et enfin fusion de la cuspidé coronaire droite avec la cuspidé non coronaire (5% des patients). Cette malformation valvulaire est associée avec un risque augmenté de pathologie aortique. La dégénérescence fibrocalcique de la valve est également médiée par des facteurs génétiques, hémodynamiques et mécaniques.

Quelque soit la morphologie de la valve aortique, l'âge reste un puissant facteur de risque de la SVA (Stewart, Siscovick et al. 1997). D'autres facteurs de risque, similaires à ceux retrouvés dans l'athérosclérose, favorisent le développement d'une SVA comme le sexe masculin, le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'obésité, le syndrome métabolique, le diabète et les taux circulants de lipoprotéine (a) élevés (Lp(a)) (Katz, Wong et al. 2006), (Otto, Burwash et al. 1997).

Plusieurs études ont suggéré que des désordres génétiques pouvaient également être à l'origine du développement de calcifications valvulaires (Thanassoulis, Campbell et al. 2013), (Cripe, Andelfinger et al. 2004). Dans un premier temps des

mutations dans les gènes *NOTCH1* et *GATA5* ont été associés avec les valves aortiques bicuspidées chez l'Homme (Garg, Muth et al. 2005), (Shi, Tao et al. 2014). Plus récemment, une étude a montré une association entre des variants de Runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*) et de *CACNA1C* (un canal calcique voltage dépendant) et la calcification aortique (Guauque-Olarte, Messika-Zeitoun et al. 2015). D'autres études enfin ont rapporté l'implication de variants du gène codant pour le récepteur à la vitamine D, *APOE*, *APOB*, *IL-10* ou l'ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 *ENPP1*. Ces études nécessitent néanmoins d'être répliquées sur des cohortes plus importantes (Bosse, Mathieu et al. 2008). Dans la première étude d'association pangénomique utilisant une randomisation mendélienne dans le cadre de la SVA, le gène *LPA* (Lipoprotein A, rs10455872) a été associé avec la présence de calcifications aortiques et une manifestation clinique de SVA (Thanassoulis, Campbell et al. 2013). Une seconde étude a quant à elle montré une association entre la prédisposition génétique à des taux élevés de cholestérol, la présence de calcifications aortiques et d'une SVA (Smith, Luk et al. 2014).

I.2.2. Physiopathologie de la SVA

1.2.2.1 Structure de la valve aortique normale

La valve aortique normale est composée de 3 cuspidées nommées en fonction de leur localisation par rapport aux artères coronaires : la cuspidée coronaire gauche, la cuspidée coronaire droite et la cuspidée non coronaire. La valve aortique normale est recouverte d'une monocouche de cellules endothéliales et présente une épaisseur inférieure au millimètre. Chaque cuspidée est composée de 3 feuillets histologiques de composition différente en MEC, conférant à la valve aortique ses propriétés biomécaniques (Chen and Simmons 2011).

L'endothélium

Composé de cellules endothéliales valvulaires (VEC), cette couche cellulaire représente une surface de contact non-thrombotique avec le sang (Butcher, Mahler et al. 2011). A l'inverse des couches endothéliales des artères, l'endothélium valvulaire est orienté perpendiculairement au flux sanguin avec des particularités différentes en fonction de la localisation ventriculaire ou aortique (Latif, Sarathchandra et al. 2005).

La ventricularis

Cette couche histologique se trouve au versant ventriculaire de la valve. Représentant 20 à 30% de l'épaisseur de la valve normale, la ventricularis est composée essentiellement de fibres élastiques disposées longitudinalement. Le collagène (I, III et IV) présent au sein de cette couche renforce la structure pour résister aux déformations tissulaires répétées permettant le maintien de l'architecture tissulaire (Butcher, Mahler et al. 2011).

La spongiosa

La spongiosa est essentiellement composée de glycosaminoglycanes et protéoglycanes sur une matrice riche en collagène I et III (Chen and Simmons 2011). Elle représente 29 à 35% de la valve aortique normale. De par la composition riche en glycanes, la spongiosa joue le rôle de coussin amortisseur au sein de la valve aortique.

La fibrosa

Cette couche est la plus volumineuse de la valve aortique représentant plus de 40% de l'épaisseur totale de la valve. La fibrosa est composée de fibronectine, mais surtout de fibres de collagène essentiellement de type I, ce qui confère à la valve une résistance mécanique importante permettant de maintenir l'intégrité tissulaire. La composition de cette couche apporte donc une part de rigidité à la structure

nécessaire pour contenir les forces oscillatoires générées par le sang lors de la chute de la colonne de sang durant la diastole (Butcher, Mahler et al. 2011).

Les cellules résidentes de la valve aortique sont les VIC, les CML (environ 5%) et les cellules endothéliales (Taylor, Allen et al. 2000). Les VIC sont les cellules les plus représentées et les CML sont présentes au niveau de la ventricularis (Latif, Sarathchandra et al. 2015). Les caractéristiques des VIC seront présentées plus précisément dans la partie I.2.3.

Comme dans l'athérosclérose, les macrophages peuvent avoir un rôle important dans le développement de la SVA. Il a d'ailleurs déjà été décrit une infiltration de cellules inflammatoires dans les valves aortiques sténosées et calcifiées (Lee and Choi 2016), (Otto, Kuusisto et al. 1994). Les zones riches en cellules inflammatoires sont associées à l'expression de cytokines proinflammatoires comme le TNF α et l'IL-1 β (Yu, Seya et al. 2011). D'ailleurs, l'infiltration macrophagique est plus importante dans les valves aortiques bicuspides (prédisposées à une calcification plus précoce) par rapport aux valves aortiques tricuspides (Moreno, Astudillo et al. 2011). Comme dans l'athérosclérose, les macrophages infiltrés peuvent jouer différents rôles, d'une part sur le versant inflammatoire de la pathologie d'autre part dans le remodelage de la MEC. Ainsi, l'infiltrat inflammatoire dans les valves serait associé à la progression et au degré de calcification de la valve aortique pathologique (Cote, Mahmut et al. 2013), (Nagy, Andersson et al. 2011), (Hjortnaes, Butcher et al. 2010). Néanmoins, pour le moment, peu d'études se sont intéressées aux caractéristiques phénotypiques des macrophages dans la SVA. Une étude en 2012 a mis en évidence des macrophages M2 dans les valves sténosées et en 2014, une autre équipe montre un déséquilibre M1/M2 plus important dans les valves bicuspides, mais sans répondre à la question du rôle de chacune des populations (Wang, Chen et al. 2014).

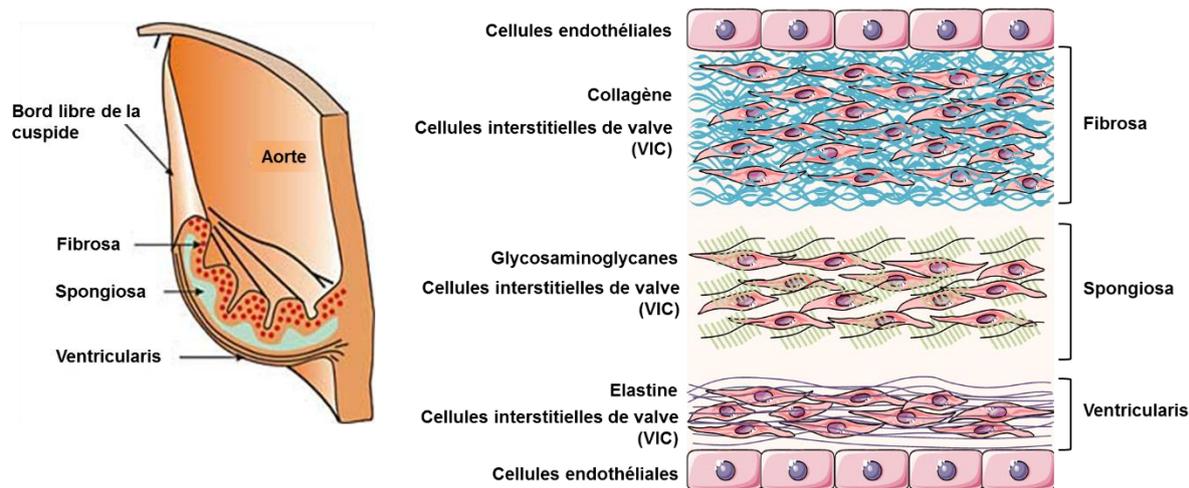


Figure 12 : Structure schématique (A) et architecture cellulaire (B) d'une cuspside de valve aortique. (D'après Rajamannan et al, 2011)

1.2.2.2 Classification de la sténose aortique

Il est indispensable de caractériser précisément la sévérité de la SVA pour assurer le suivi des patients. Le diagnostic de la SVA se fait préférentiellement par échographie couplée au doppler (Baumgartner, Hung et al. 2009). Cette technique permet de discerner la nature anatomique de la valve (tricuspide/bicuspside) et d'évaluer l'épaississement des cuspsides de la valve. Trois paramètres sont utilisés pour classer les degrés de sévérité de la SVA en légère, modérée ou sévère (tableau II) : la surface aortique (en cm^2), ou la surface aortique indexée (en cm^2/m^2), le gradient transvalvulaire moyen (différence de pression entre le ventricule gauche et l'aorte en systole) et la vélocité maximale du jet transvalvulaire (vitesse sanguine transvalvulaire en m/s).

Tableau II : Classification de la sévérité de la sténose aortique

Paramètres échographiques	Légère 	Modérée 	Sévère 
Surface aortiques (cm ²)	< 1,5	1 – 1,5	< 1
Gradient transvalvulaire moyen (mmHg)	< 20 ⁽¹⁾ < 30 ⁽²⁾	20 – 40 ⁽¹⁾ 30 – 50 ⁽²⁾	> 40 ⁽¹⁾ > 50 ⁽²⁾
Vélocité maximale du jet transvalvulaire (m/s)	2,6 – 2,9	3 – 4	> 4
Surface aortique indexée (cm ² /m ²)	> 0,85	0,6 – 0,85	< 0,6

Les seuils de classification pour le gradient transvalvulaire moyen sont différents entre les recommandations des Sociétés Européenne et Américaine de Cardiologie (1) ESC (European society of cardiology) et (2) ACC/AHA (American college of cardiology/American heart association).

1.2.2.3 Compréhension actuelle des processus impliqués dans la SVA

Les valves sténosées révèlent 2 processus prépondérants : la fibrose et la calcification, tous deux capables d'altérer les propriétés biomécaniques de la valve. Dans près de 15% des valves calcifiées, on observe une vraie métaplasie osseuse avec la présence d'ostéoblastes, de chondrocytes et de moelle osseuse (Steiner, Kasparova et al. 2007). De larges zones d'infiltration macrophagique sont souvent retrouvées au sein de ces valves. Il est maintenant établi que les calcifications se forment, dans un premier temps, au versant aortique, la minéralisation prenant souvent initiation dans les zones de dépôts lipidiques. Ces différentes données tendent à montrer que la dégénérescence fibrocalcique de la valve est une réponse aux lésions et que les processus communs avec l'athérosclérose comme l'inflammation due aux lipides modifiés sont impliqués. Il est clair que les interconnexions entre la MEC et les cellules présentes dans la valve (résidentes ou infiltrées) sont primordiales dans les processus de réparation physiologique et pathologique de la valve aortique.

La composante lipidique

De récentes études visent à montrer une infiltration de lipoprotéines dans la valve aortique ainsi que leur rôle majeur dans l'initiation de l'inflammation précédant la minéralisation valvulaire pathologique dans la SVA (Steiner, Kasparova et al. 2007). Ainsi, des études histologiques ont montré que plusieurs apolipoprotéines (ApoE, apoB, apoA1 ou encore apo(a)) sont présentes au sein du tissu valvulaire calcifié. De plus, il a été démontré que les niveaux de LDL oxydées retrouvées dans la valve sont associés avec le degré d'inflammation et le remodelage de la valve. Les processus de stress oxydatif sont fortement activés menant à la formation d'anions peroxydes et superoxydes pouvant participer à la production de lipides oxydés possédant des propriétés ostéogéniques (Miller, Chu et al. 2008). Ainsi, l'accumulation et la rétention des lipoprotéines est un évènement crucial dans la physiopathologie de la SVA.

Inflammation

Le tissu valvulaire calcifié est infiltré par des macrophages, des mastocytes ainsi que des lymphocytes. Néanmoins, pour le moment, peu de choses sont connues sur le rôle de l'immunité adaptative dans la SVA. En ce qui concerne l'immunité innée, quelques études ont montré l'implication des Toll like receptors dans l'induction du phénotype ostéoblastique des VIC (Venardos, Nadlonek et al. 2014), (West, Malinin et al. 2010).

Les macrophages peuvent sécréter du $TNF\alpha$ et activer le récepteur 1A de cette famille menant à l'expression d'IL-1 β et d'IL-6. Ces cytokines ont un rôle critique dans la reprogrammation des VIC en induisant l'expression notamment de MSX2 *via* la production de ROS par la stimulation par le $TNF\alpha$ (Yu, Boston et al. 2001), (Isoda, Matsuki et al. 2010). L'IL-6 est une autre cytokine fortement impliquée dans le phénotype ostéoblastique des VIC. Son inhibition réduit l'expression de bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) et entraîne une diminution des calcifications *in vitro* (El Hussein, Boulanger et al. 2014). Dans les cellules osseuses, l'IL-6 induit l'expression de Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL) qui, à son tour, activera les VIC qui produiront de la MEC (Kaden, Bickelhaupt et al. 2004). A

l'inverse l'administration d'ostéoprotégérine (OPG) à des souris déficientes pour le récepteur aux LDL inhibe la formation des calcifications et l'expression de gènes ostéogéniques dans la valve aortique (Weiss, Lund et al. 2013).

Fibrose et remodelage

Jusqu'à présent, les voies de signalisation impliquées dans ce stade fibrotique de la valve ne sont pas clairement définies. Durant les prémices du remodelage, les VIC peuvent contribuer à la rupture de la structure en trois couches de la valve *via* la dégradation des protéines de la MEC, des changements dans la stœchiométrie et dans la localisation des composants de la matrice. Ainsi, les MMP et les cathepsines semblent être des régulateurs importants pour maintenir l'intégrité et la souplesse de la valve aortique native. L'expression des MMP-2, -3 et -12 a déjà été documentée dans la valve aortique calcifiée (Edep, Shirani et al. 2000), (Bosse, Miqdad et al. 2009), tout comme l'expression des cathepsines S, K et V (Helske, Syvaranta et al. 2006). Dans un contexte pathologique, ces enzymes pourraient jouer un rôle important dans la formation du tissu sclérotique en permettant la production de fragments de collagène pro-inflammatoires (Qin, Corriere et al. 2006) et de fragments d'élastine pro-calcifiants (Aikawa, Aikawa et al. 2009). L'axe transforming growth factor beta (TGF β) / Smad2-3, qui est considéré comme un médiateur anti-inflammatoire et une cytokine pluripotente qui entraîne la fibrose d'organes, est également impliqué dans la dégénérescence de la valve. Le TGF- β 1 peut induire l'apoptose des cellules et la formation de nodules calcifiés. Récemment, il a également été montré que le TGF- β 1 pourrait améliorer la synthèse du collagène et le stress oxydatif dans des VIC isolées à partir de valves aortiques porcines (Das, Holmes et al. 2013).

Angiogenèse

La valve est normalement avasculaire. Ce phénotype semble être du en partie, à la présence de chondromoduline-I, un facteur anti-angiogénique qui est abondamment exprimé dans les valves normales, mais nettement sous exprimé dans les valves pathologiques. Cette perte d'expression entraîne une expression accrue du facteur angiogénique Vascular endothelial growth factor VEGF, ainsi que des protéases qui

favorisent le remodelage des tissus, y compris la MMP-1, MMP-2 et MMP-13, favorisant ainsi l'angiogenèse (Yoshioka, Yuasa et al. 2006). Dans les lésions avancées, l'histologie des valves présente de nombreux nouveaux vaisseaux sanguins associés à l'expression de facteurs angiogéniques tels que le VEGF ou Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1 α) (Perrotta, Moraca et al. 2015). L'origine des cellules qui forment ces nouveaux vaisseaux est mal comprise pour le moment. Certaines des cellules endothéliales formant ces néovaisseaux peuvent provenir de plusieurs sources, y compris les cellules endothéliales de la surface valvulaire, des cellules progénitrices endothéliales circulantes et / ou des VIC (Soini, Salo et al. 2003). Dans les lésions précoces, des bourgeons vasculaires sont présents, associés aux VIC exprimant α -SMA, le VEGF récepteur-2, et Tie-2. Enfin, une étude publiée en 2016 a montré que des VIC pouvaient acquérir des capacités de cellules péricytaire et agir conjointement avec les cellules endothéliales valvulaires (VEC) pour contribuer à la formation de néo-vaisseaux au sein de la valve et favoriser le développement de la SVA *via* l'axe Angiopoietin1-Tie2-ROCK (Arevalos, Berg et al. 2016).

Minéralisation

Comme dans le cas des calcifications vasculaires, plusieurs processus sont impliqués dans le développement des foyers de calcification au sein de la valve aortique. La minéralisation de la valve démarre au niveau de la fibrosa et s'étend ensuite dans le tissu en désorganisant l'architecture de la valve. Il est maintenant connu que l'endothélium exprime des gènes inhibant les processus de calcification (Simmons, Grant et al. 2005). Les VIC forment la population cellulaire majoritaire au sein de la valve aortique. Au cours du développement fibrocalcique de la SVA, les VIC sont capables de moduler plusieurs processus impliqués dans la formation des calcifications menant à la diminution de la surface valvulaire fonctionnelle. Ces processus de calcification seront décrits dans le chapitre II.

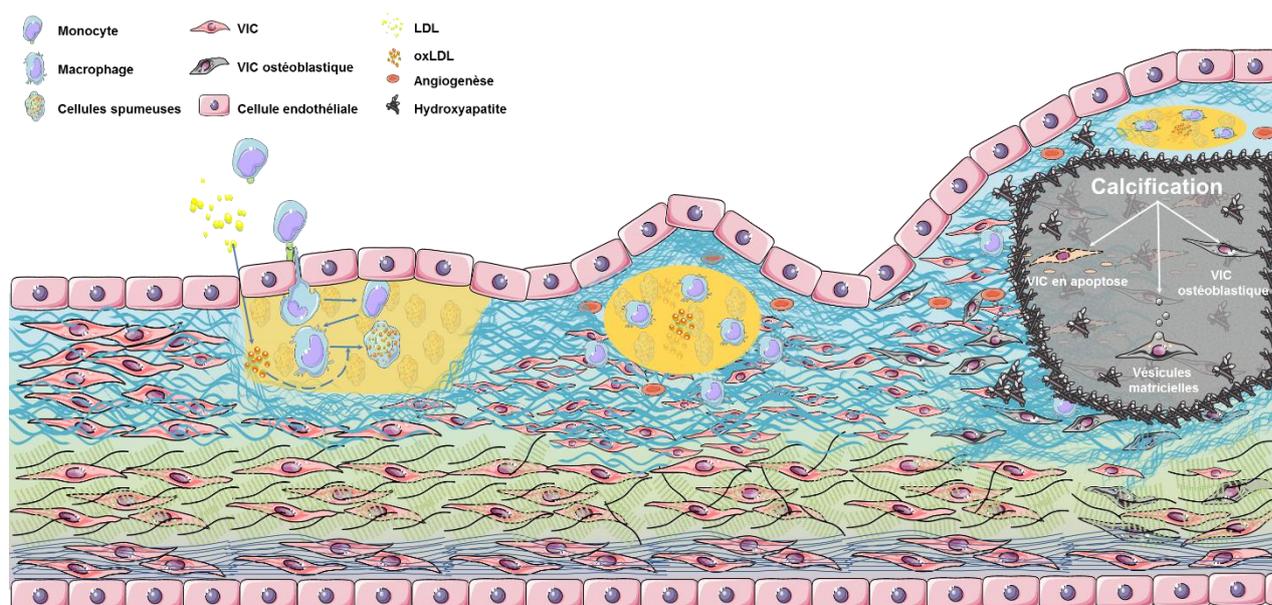


Figure 13 : Schéma de la dégénérescence fibro-calcique de la valve aortique.

Le stress mécanique subi par la valve aortique induit une dysfonction endothéliale laissant passer les LDL sanguins dans l'espace sous endothélial. L'oxydation des LDL favorise le recrutement de monocytes qui se différencient en macrophages dans la fibrosa et prennent en charge ces oxLDL en se transformant en cellules spumeuses. La production de MMP par ces cellules et la production de collagène par les VIC pour réparer les dommages tissulaires entraînent une importante fibrose autour du noyau lipidique formé par les cellules spumeuses et macrophages infiltrés. Les cytokines pro-inflammatoires produites par les macrophages et cellules spumeuses stimulent les VIC qui acquièrent un phénotype ostéogénique favorisant la formation de calcifications *via* l'expression de phosphatase alcaline, d'ostéocalcine, d'ostéonectine, mais aussi *via* la production de vésicules matricielles servant de nid de nucléation pour les calcifications, tout comme les VIC en apoptose. La formation de néo-vaisseaux permet l'entretien de ces phénomènes et la survie des cellules

La physiopathologie de l'athérosclérose vasculaire et de la SVA partagent de nombreuses similarités. Néanmoins, la SVA présente des caractéristiques propres, telles que la prédominance du processus de calcification parmi tous les processus impliqués, une évolution lente de la lésion et une localisation au sein d'une zone de forte pression hémodynamique. Plusieurs études ont montré que de nombreux patients atteints de SVA présentent également une atteinte des artères coronaires (Losi, Brevetti et al. 2010). Il est également clair que les prémices de ces deux pathologies partagent l'implication des lipides, leur oxydation et l'inflammation consécutive au recrutement des cellules immunitaires (Hansson 2005), (Otto, Kuusisto et al. 1994), (Leitinger 2003). De plus, dans les deux cas, la monocouche endothéliale retrouvée à la surface des vaisseaux ou de la valve dont le rôle est de maintenir l'homéostasie tissulaire par le trafic mécanique et biochimique, est lésée. Malgré ces similarités, l'endothélium valvulaire présente un alignement perpendiculaire au flux au niveau aortique, alors que les cellules endothéliales

vasculaires sont alignées parallèlement au flux (Butcher, Penrod et al. 2004). Ces différences d'arrangement induisent donc des différences dans les adhésions focales favorisant l'épaississement valvulaire au niveau des zones où le flux est le plus turbulent. La production de cytokines pro inflammatoires dans ces zones favorise le recrutement et l'infiltration des cellules immunitaires.

Alors qu'il existe un grand nombre de similarités des stades précoces de la SVA et de l'athérosclérose vasculaire, les stades avancés présentent d'importantes différences structurelles. La plaque d'athérome est caractérisée par une chape fibreuse riche en CML, formation qui n'est pas retrouvée autour des calcifications valvulaires (Butcher, Penrod et al. 2004). Les VIC se différencient et produisent des MMP et des BMP favorisant les dépôts calciques, processus prépondérant dans la SVA. Ainsi, la « chape calcique » produite dans la valve se constitue au long de plusieurs années entraînant des manifestations cliniques chroniques, à savoir l'angor, la syncope ou l'insuffisance cardiaque. A l'inverse, la plaque d'athérome est souvent plus fragile, susceptible de se rompre et d'entraîner des accidents ischémiques aigus. Ainsi, même si le développement de la plaque d'athérome est relativement progressif, la pathologie peut être dramatiquement accentuée par un accident ischémique aigue tel qu'un IDM ou un AVC.

Tableau III : Comparaison entre la sténose valvulaire aortique et l'athérosclérose

(D'après Otto and O'Brien, 2001; Freeman and Otto, 2005)

	Sténose valvulaire aortique	Athérosclérose
Caractéristiques histo-pathologiques		
Accumulation lipoprotéines	++++	++++
Oxydation des lipides	++++	++++
Calcification	+++++	++
Inflammation	++++	++++
Marqueurs inflammatoires Systémiques	++	++
Polymorphisme génétique	++	+++
Type cellulaire majoritaire	VIC	CML, Macrophages
<i>Mécanisme des événements cliniques</i>	<i>Rigidité valvulaire</i>	<i>Instabilité de la plaque</i>
Facteurs de risque		
Âge	++++	++++
Sexe	++++	++++
Tabagisme	+++	++++
Hypertension	+++	++++
Dyslipidémie	+++	++++
Diabète	+	+++++
Dysfonction endothéliale	++	++++

1.2.2.4. Traitements de la SVA

A ce jour, le seul traitement efficace de la SVA est de remplacer la valve native fibrocalcifiée par une valve prothétique. Ce remplacement peut se faire chirurgicalement sous circulation extracorporelle ou *via* un abord percutané par cathétérisme.

Remplacement valvulaire par chirurgie

Le premier remplacement valvulaire chirurgical a eu lieu en 1960, et depuis lors, de nombreuses avancées dans la technique et la prise en charge de l'acte chirurgical ont été réalisées (Harken, Soroff et al. 1960). Les valves prothétiques peuvent être mécaniques ou bioprothétiques. Néanmoins, de plus en plus de patients reçoivent une valve bioprothétique, les valves mécaniques imposant la poursuite d'un traitement anticoagulant, tandis que les bioprothèses sont d'une durée de vie plus

courte à cause de leur rapide dégénérescence. Les bioprothèses sont composées de cuspides biologiques issues de péricarde porcine ou bovine monté sur un stent métallique ou en polymère. Il existe également des bioprothèses sans stent conçues à partir de valves aortiques porcines intactes ou à partir de péricarde bovin possédant de meilleures performances hémodynamiques mais nécessitant une opération plus longue. La dégénérescence de ces prothèses est mal connue, mais pourrait être due à une colonisation du tissu péricardique animal par des cellules circulantes. Dans certains cas, le patient peut recevoir une homogreffe (valve collectée sur un donneur) mais cette alternative reste assez peu réalisée.

Remplacement valvulaire percutané

Pour les patients à haut risque opératoire, une alternative a été mise au point récemment. La valve cardiaque est remplacée par voie percutanée (TAVI). Le TAVI a démontré un intérêt dans le traitement chez les patients à haut risque chirurgical avec une réduction nette de la mortalité per-opératoire (PARTNER NEJM). Plusieurs abordages sont possibles pour cette technique : la voie transfémorale, la voie transapicale et la voie transaortique. Néanmoins, la voie la plus courante reste la voie fémorale, voie utilisée dans près de 2/3 des opérations réalisées (Gilard, Eltchaninoff et al. 2012). Le TAVI, même si il est moins invasif que l'opération à cœur ouvert, peut présenter malgré tout des complications. La complication la plus notable est la régurgitation paravalvulaire, directement corrélée au risque de mortalité postopératoire (Genereux, Head et al. 2013). D'autres complications plus rares sont parfois rencontrées, à savoir des lésions vasculaires, un blocage cardiaque, une obstruction coronaire ou encore une rupture de l'aorte.

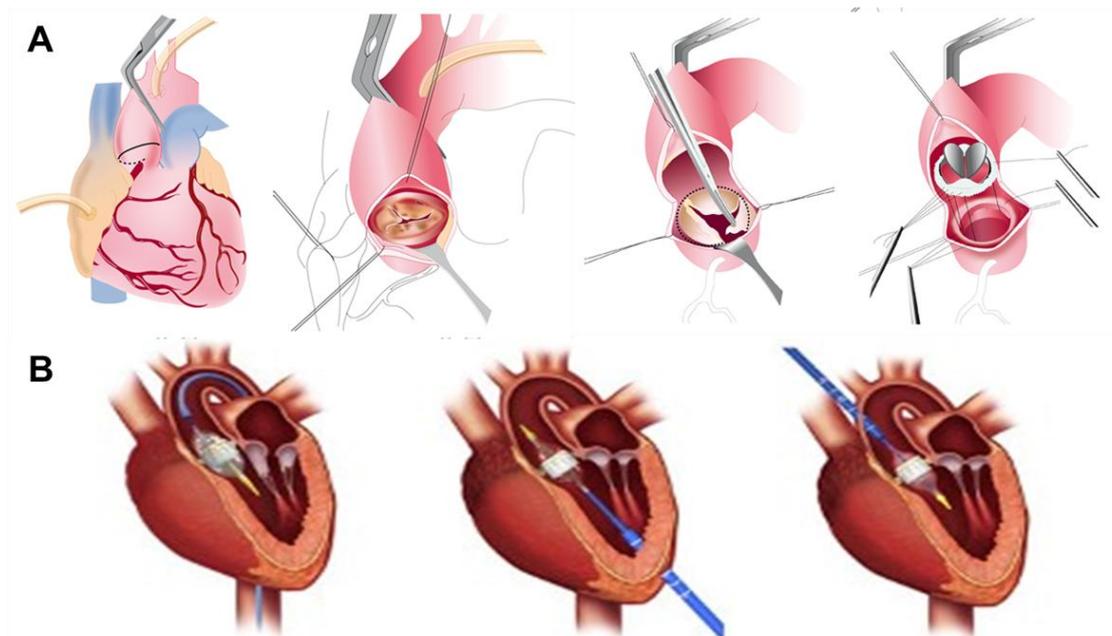


Figure 14 : Techniques de remplacement valvulaire.

A) remplacement chirurgical classique. B) remplacement valvulaire aortique par voie percutanée (abord fémoral, apical, transaortique)

Traitement pharmacologique

Des études ayant montré l'association du LDL-cholestérol et la présence d'une calcification valvulaire, des études pharmacologiques visant à diminuer les lipides ont été réalisées. Les statines, molécules hypolipémiantes efficaces dans la prise en charge des pathologies cardiovasculaires d'origine athéroscléreuse, n'ont pas montré d'effet sur l'évolution de la sténose aortique (études cliniques SALTIRE, RAAVE, SEAS, ASTRONOMER) (Pedersen 2008). Les effets secondaires des statines pourraient même être plus importants que les effets bénéfiques, ces molécules ayant des effets procalcifiants, augmentant la résistance à l'insuline et les taux de Lp(a) (Capoulade, Mahmut et al. 2015). Les nouveaux agents hypolipémiants tels que les anticorps anti-PCSK9 pourraient constituer une alternative à tester dans le cas de la SVA.

I.2.3. Les cellules interstitielles de valve (VIC)

Les VIC représentent la principale composante cellulaire présente au sein de la valve aortique normale. Ces cellules fusiformes sont responsables du maintien de la structure valvulaire en assurant le turn-over de la MEC afin de résister aux forces subies par la valve au cours de la révolution cardiaque. Des études tendent à montrer que lors des dommages tissulaires, les VIC sont capables de s'activer et de prendre part au remodelage réparateur de la matrice valvulaire. Plusieurs équipes ont tenté de classer les VIC selon leur fonction spécifiques ((Liu, Joag et al. 2007), (Stout and Otto 2007). Les VIC se déclinent alors en :

- VIC progénitrices (pVIC) : Cette population constituerait une sorte de réservoir cellulaire présent au sein de la valve ou issu de la circulation sanguine. Ainsi, les pVIC pourraient se différencier en VIC activées (aVIC) ou VIC ostéoblastiques (obVIC) en fonction des stimuli du microenvironnement (Visconti, Ebihara et al. 2006), (Hajdu, Romeo et al. 2011).
- VIC quiescentes (qVIC) : Ces cellules seraient prédominantes au sein de la valve aortique normale et joueraient un rôle majeur dans le renouvellement continu de la MEC en la dégradant et la resynthétisant (Latif, Sarathchandra et al. 2005), (Aikawa, Whittaker et al. 2006).
- VIC activées (aVIC) : Ce phénotype serait issu de l'activation des qVIC. L'agression de l'endothélium valvulaire entraîne la production de NO et de cytokines proinflammatoires comme le TNF α ou l'IL-1 β initiant l'activation des qVIC (Ngo, Sverdlov et al. 2012). Les aVIC expriment alors des protéines myofibroblastiques comme l' α -actine et la smooth muscle myosine, mais également des MMP et des cathepsines (Rabkin-Aikawa, Farber et al. 2004). L'activation en aVIC pourrait également se faire par des voies de mécanotransduction suite à la détection d'une modification dans les forces appliquées au tissu valvulaire. Ces aVIC ont un pouvoir prolifératif et migratoire important leur permettant de rejoindre la lésion tissulaire et de remodeler la MEC endommagée (Butcher, Mahler et al. 2011). Une fois la lésion réparée, les cellules entrent en apoptose. Ainsi, une activation massive de qVIC peut

mener à un remodelage accru mais également à un nombre important de cellules en apoptose pouvant servir de point de nucléation des calcifications (Desmouliere, Redard et al. 1995). La dérégulation de la prolifération des aVIC pourrait ainsi participer activement aux processus de fibrose et de calcification favorisant la rigidification de la valve, induisant de nouvelles forces et une augmentation accrue de l'activation des VIC (Cirka, Kural et al. 2015).

- VIC ostéoblastiques (obVIC): Ce dernier phénotype régulerait l'activité ostéogénique au sein de la valve. Les obVIC pourraient alors exprimer le facteur de transcription ostéoblastique RUNX2, sécréter des médiateurs ostéogéniques comme la phosphatase alcaline (ALP) ou la BMP-2 et des protéines de matrice osseuse comme l'ostéopontine (Mohler, Gannon et al. 2001).

Il est à noter que les VIC pourraient également exprimer simultanément des marqueurs de ces différents phénotypes. Pour l'instant, il n'existe pas de réel consensus sur l'existence de ces phénotypes, cette catégorisation théorique permettant surtout de schématiser la complexité des processus et des acteurs prenant part au développement de la SVA.

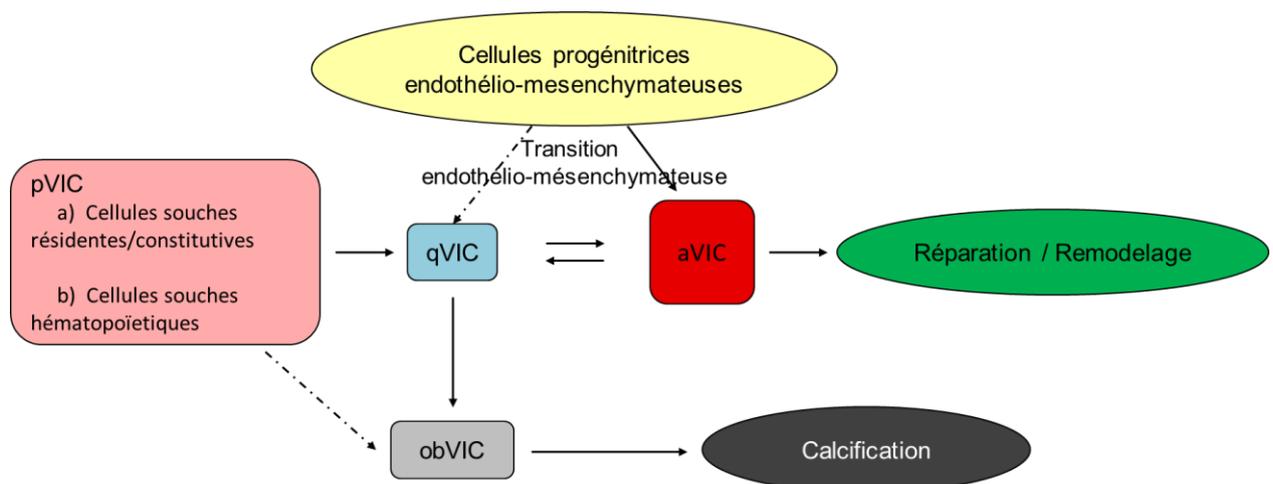


Figure 15 : Représentation schématique des phénotypes théoriques des VIC au sein de la valve aortique. D'après Liu et al 2007

CHAPITRE II CALCIFICATIONS CARDIOVASCULAIRES

II.1 Epidémiologie

Les calcifications vasculaires sont retrouvées à plus de 90% chez les hommes et plus de 67% chez les femmes de plus de 70 ans (Bild, Detrano et al. 2005). Au niveau de la valve aortique, 25% des personnes de plus de 65 ans présentent un épaissement des feuillets, ce chiffre montant à 50% chez de sujets de plus de 85 ans (Coffey, Cox et al. 2014). Ces calcifications ectopiques sont donc associées à l'âge, mais aussi aux maladies cardiovasculaires athéromotiques, au diabète de type 2 et à l'insuffisance rénale chronique. Il est aujourd'hui démontré que les calcifications vasculaires peuvent jouer un rôle double dans la stabilisation de la plaque en fonction de la localisation des dépôts calciques (Criqui, Denenberg et al. 2014), (Ehara, Kobayashi et al. 2004). En effet, les calcifications denses au niveau du cœur de la plaque auront un rôle stabilisateur. A l'inverse, les microcalcifications trouvées au sein de la chape fibreuse déstabilisent la plaque en perturbant l'intégrité du tissu collagénique (Hutcheson, Goettsch et al. 2016).

Les calcifications vasculaires sont retrouvées au sein de tout l'arbre artériel. Les manifestations cliniques de ces calcifications sont diverses et correspondent à des phénotypes particuliers. La calcification intimale est caractéristique de l'athérosclérose et est caractérisée par la survenue de processus inflammatoires, secondaires à l'infiltration de lipides et une nécrose cellulaire. La calcification médiale est souvent associée à une insuffisance rénale chronique induisant une hyperphosphatémie, des dérangements urémiques, mais aussi des désordres génétiques comme le syndrome de Marfan, ou la calcification artérielle généralisée infantile (Demer and Tintut 2014). La calcification valvulaire aortique résulte d'un ensemble de processus et événements de type athéroscléreux au sein de la valve aortique soumise à un fort stress mécanique (Bostrom, Watson et al. 1993).

II.2 Physiologie générale de l'ostéogenèse

Les calcifications cardiovasculaires ont longtemps été décrites comme des dépôts passifs de minéraux au sein du tissu. Néanmoins, depuis maintenant plusieurs années, il a été démontré que ce phénomène est régi par des mécanismes hautement régulés reproduisant le processus d'ossification physiologique (Stary 2000), (Freeman and Otto 2005).

L'ossification, ou ostéogenèse, est le processus physiologique par lequel le tissu conjonctif est transformé en tissu osseux. Ce processus se déroule selon deux phases, l'ossification primaire et l'ossification secondaire.

L'ossification primaire correspond à la formation même de l'os, à partir d'un support non osseux. Elle peut se faire à partir d'un tissu conjonctif, auquel cas on parlera de formation endoconjonctive. Ce phénomène a lieu au niveau des os plats. Elle peut se faire également à partir d'un tissu cartilagineux hyalin. Cette ossification, appelée ossification endochondrale ou enchondrale se déroule au niveau de la diaphyse des os long mais également au niveau de l'épiphyse des os longs et courts (Berendsen and Olsen 2015), (Mackie, Ahmed et al. 2008).

L'ossification secondaire correspond au renouvellement de l'os déjà formé et fait donc appel au préalable à des processus de résorption de la matrice osseuse.

Trois grands types cellulaires participent à la formation de la matrice calcifiée et à la résorption du calcium, et sont responsables de la physiologie osseuse.

Les ostéoblastes sont des cellules jeunes d'origine mésenchymateuse responsables de la production de la matrice osseuse *via* l'élaboration d'un tissu osseux immature (riche en collagène). La calcification de ce tissu ostéoïde est induite par l'ostéopontine, l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline et la bone sialoprotein synthétisée par ces ostéoblastes. Une fois cette matrice produite, les ostéoblastes peuvent alors retrouver un état quiescent, entrer en apoptose ou se différencier en ostéocytes.

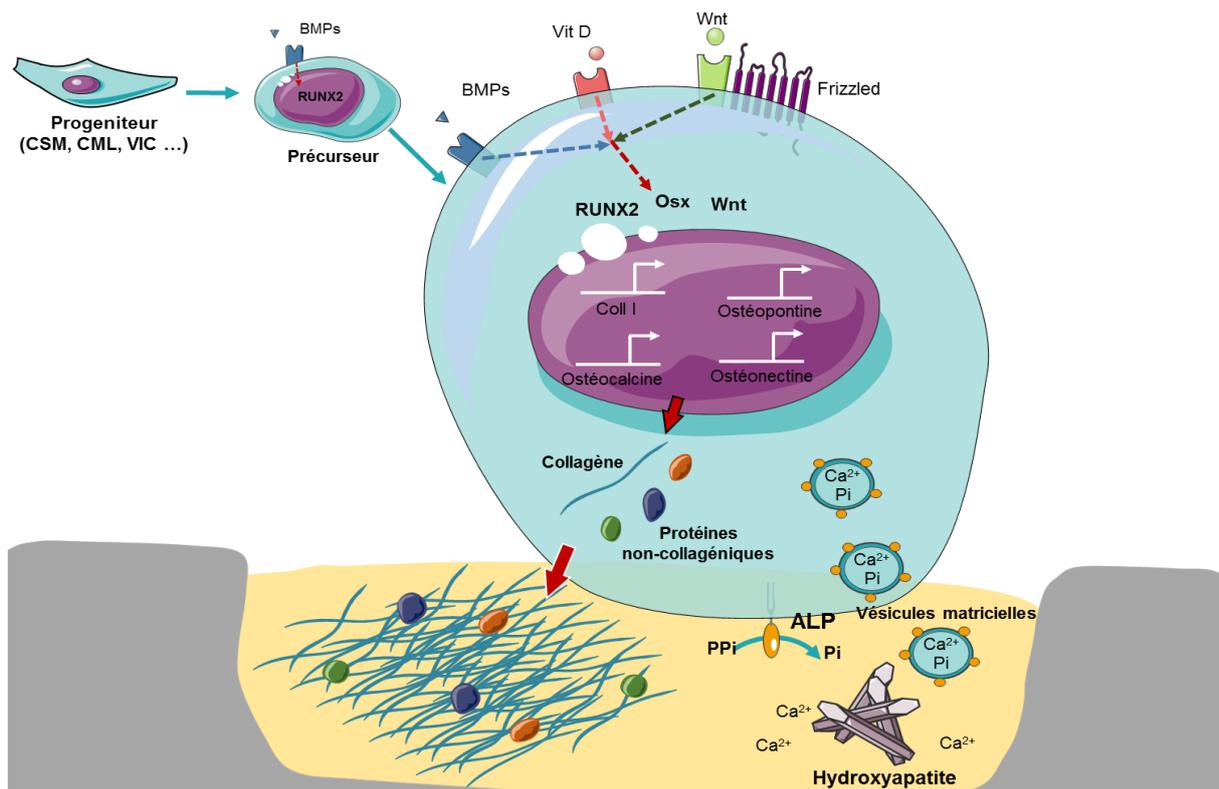


Figure 16 : Schéma de la formation des cellules de type ostéoblastique et résumé schématique de la synthèse de matrice calcifiée. Sous l'action de stimuli extérieurs, les progéniteurs vont exprimer le facteur de transcription RUNX2, indispensable à la différenciation ostéoblastique. Pour produire la matrice calcifiée, l'ostéoblaste va synthétiser du collagène et des protéines non collagéniques (Ostéopontine, ostéocalcine, ostéonectine...) formant la phase inorganique de la matrice. Par l'exocytose de vésicules matricielles portant des enzymes telles que la phosphatase alcaline, les ostéoblastes contribuent à la formation de cristaux de calcium-phosphate (hydroxyapatite) formant la phase organique de la matrice calcifiée.

Les ostéocytes sont les cellules osseuses matures résidant au sein de la matrice osseuse et dans des cavités appelées « ostéoplastes ». Il est maintenant admis que ces cellules jouent un rôle de transmission des signaux mécano-sensoriels en envoyant des signaux aux cellules à la surface de l'os et en modulant leur activité. Ces cellules sont également capables de remodeler leur environnement par résorption et production des composants organiques et inorganiques de l'os (Tang, Herber et al. 2012).

Enfin, **les ostéoclastes** sont de grandes cellules multinucléées, d'origine hématopoïétique, et de la famille des macrophages. Ces cellules sont fixées à la matrice osseuse calcifiée *via* des intégrines (notamment $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_2\beta_1$) au sein de lacunes appelées lacunes de Howship (Rodan and Rodan 1997). Là, les ostéoclastes vont dégrader l'os d'une part en diminuant le pH par l'intermédiaire des anhydrases carboniques et de pompes à protons pour dissoudre la phase minérale de l'os, et d'autre part en synthétisant et libérant des enzymes comme les cathepsines et les collagénases pour digérer les constituants organiques de la matrice osseuse (Vaananen, Zhao et al. 2000).

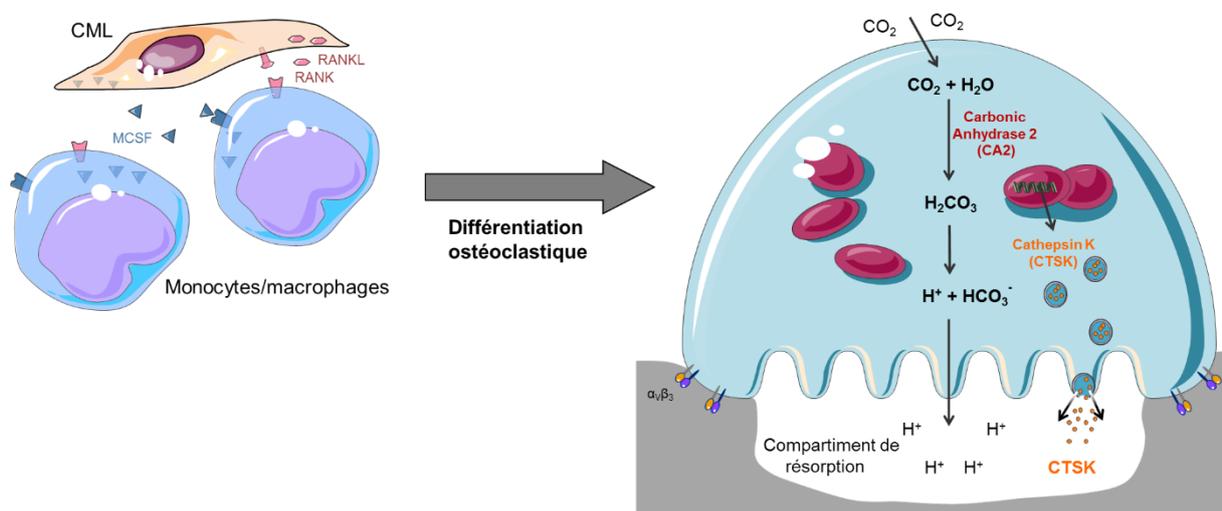


Figure 17 : Mécanisme potentiel de la formation de cellules de type ostéoclastique au sein de la lésion athéroscléreuse et résumé schématique de la résorption de la matrice calcifiée. La production de RANKL par les CML et de MCSF par les CML et les macrophages de la lésion pourrait induire la différenciation ostéoclastique des monocytes infiltrés. Pour dégrader la matrice, ces cellules ostéoclastiques vont dans un premier temps acidifier le milieu grâce à la production de H_2CO_3 par la carbonic anhydrase 2, dissolvant la phase minérale. D'autre part, la production de cathepsines (notamment la cathepsine K), permet la digestion de la phase inorganique de la matrice

II.3 Processus impliqués dans la calcification artérielle

Des mutations génétiques peuvent être liées à la calcification artérielle. Des études d'association pangénomique ont identifié des sites liés aux calcifications coronaires (O'Donnell, Kavousi et al. 2011). Ces gènes codant pour des cyclines qui pourraient être liées aux processus d'inflammation et de sénescence des cellules.

De plus, la dérégulation des processus inflammatoires et métaboliques tels que les dyslipidémies ou le diabète peuvent conduire à des processus d'ossification similaires à ceux rencontrés dans les os. Ainsi, le processus de minéralisation des tissus mous peut être le résultat d'une dérégulation des mécanismes pro- et anti-calcifiants. Quatre processus au moins sont impliqués dans ces calcifications : l'apoptose et le relargage de vésicules matricielles, la différenciation des CML en cellules de type ostéoblastique, la perte d'inhibition des inhibiteurs de minéralisation.

Différenciation ostéoblastique et ostéoclastique vasculaire

En 1993, Bostrom et al ont identifié et isolé une population de cellules médiales nommées *Calcifying Vascular Cells* (CVC) (Bostrom, Watson et al. 1993). En culture, ces cellules forment spontanément des nodules de calcification. Ces résultats tendent à démontrer la présence de cellules souches pluripotentes capables de se différencier en cellules calcifiantes (Abedin, Tintut et al. 2004). Il est maintenant démontré que les CML sont capables de se différencier en cellules de type ostéoblastique et ainsi jouer un rôle dans la formation de matrice osseuse dans les vaisseaux. Des facteurs de transcription relatifs aux cellules osseuses comme RUNX2, osterix, Sox9 ou Msx2 sont exprimés dans les CML (Bostrom, Rajamannan et al. 2011). Ces facteurs de transcription ont pour rôle de moduler la différenciation ostéoblastique et sont induits par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α qui active Msx2 ou la voie de signalisation Wnt qui aboutit à la surexpression de RUNX2 et osterix (Westendorf, Kahler et al. 2004), (Lian, Stein et al. 2006). RUNX2 et son effecteur, osterix, vont alors induire l'expression d'ostéocalcine, de sclérotine, du receptor activator of nuclear factor-kappa β ligand (RANKL), de la bone sialoprotein ou l'ALP (Bostrom, Jumabay et al. 2011), (Zhu, Gan et al. 2012). D'autres travaux ont montré que la leptine peut induire *in vitro* la minéralisation des CML en

augmentant l'expression et l'activité de la phosphatase alcaline et les dépôts de cristaux de calcium-phosphate en culture (Parhami, Tintut et al. 2001, Parhami, Tintut et al. 2001).

Ainsi, il a été démontré que RANKL favorise les calcifications *in vitro* en augmentant la sécrétion par les cellules endothéliales de BMP-2, une protéine de la superfamille TGF β impliquée dans l'ossification et la différenciation ostéoblastique, qui en stimulant les CML induit une activité ostéoblastique accrue (Davenport, Harper et al. 2016). La leptine peut également moduler l'expression du RANKL et promouvoir la différenciation ostéoblastique des CML de souris (Liu, Liang et al. 2014). La BMP-2 joue aussi un rôle dans la différenciation des CML en stoppant le cycle cellulaire, ce qui a pour conséquence une perte d'expression des protéines contractiles et un gain d'expression de marqueurs ostéogéniques, probablement *via* l'induction de Msx2 puis d'osterix (King, Iyemere et al. 2003). La BMP-2 peut également agir *via* RUNX2 qui entrainera l'expression de collagène de type I et d'ALP (Li, Yang et al. 2008).

Dans un contexte diabétique, le récepteur aux produits de glycation avancée, exprimé constitutivement par les cellules endothéliales, a également été décrit comme impliqué dans la formation de la plaque d'athérosclérose et la formation des calcifications vasculaires *via* un mécanisme impliquant la galectine-3 et la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Menini, Iacobini et al. 2013). Cette voie est également modulée lors du traitement de CML par la leptine (Zhang, Proenca et al. 1994). En effet, en 2012, il a été proposé que la leptine joue ce rôle sur la différenciation et la minéralisation des CML en inhibant la glycogen synthase kinase (GSK)-3 β (Zeadin, Butcher et al. 2012).

Quand les CML sont exposées à des niveaux élevés de phosphate, mimant le contexte pathologique des patients présentant une insuffisance rénale chronique, les marqueurs de différenciation contractile SM22 α et la SMMHC voient leur expression diminuer sous l'action du facteur de transcription Kruppel-like factor 4 (KLF4) et expriment RUNX2, l'ostéopontine, l'ostéocalcine et l'ALP (Steitz, Speer et al. 2001).

Dans des CML isolées de vaisseaux de souris génétiquement modifiées, déficientes pour la matrix Gla protein (MGP), la différenciation en cellules de type ostéoblastique

est déterminée par une augmentation d'expression de RUNX2 et une diminution d'expression de myocardine. Ces modulations géniques étaient suivies de dépôts de calcium (Speer, Yang et al. 2009). D'un point de vue mécanistique, l'activation de ERK et de la voie des MAP kinases est importante pour induire la diminution d'expression de la myocardine.

Plus récemment, il a été mis en évidence que certains miRNA peuvent réguler la différenciation des CML en cellules de type ostéoblastique. En effet, sous conditions procalcifiantes, le complexe miR-143/145 contrôlant l'expression de KLF4 est sous exprimé (Leopold 2014). D'autres comme le miR-204, miR-205, miR133a ou les miR-30b et c sont sous exprimés avant la calcification et entraînent une augmentation d'expression de RUNX2 (Balderman, Lee et al. 2012).

Les macrophages peuvent également participer à la différenciation ostéoblastique des CML comme dans le tissu osseux où des cellules de type macrophagique sont retrouvées au niveau des zones de remodelage. Là, les macrophages génèrent un environnement ostéogénique en dégradant la matrice et en produisant des signaux favorisant le recrutement, la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques. Il a d'ailleurs été montré que les monocytes/macrophages augmentent les calcifications vasculaires *via* 2 mécanismes indépendants à savoir l'interaction cellule-cellule et la production de cytokines. En effet, la coculture directe de cellules vasculaires calcifiantes et de monocytes augmente significativement l'activité phosphatase alcaline de façon proportionnelle au nombre de monocytes de la coculture. Néanmoins, les milieux conditionnés de ces monocytes/macrophages ou des études de coculture indirecte n'ont pas montré d'effet sur ces cellules calcifiantes vasculaires suggérant un rôle du contact direct entre les monocytes/macrophages et ces cellules (Tintut, Patel et al. 2002). A l'inverse, une étude de 2012 a montré que les milieux conditionnés de cellules de lignée macrophage RAW264.7 augmentaient l'expression de BMP-2 par les CML et diminuaient l'expression de la MGP. Cet effet semble dû à la présence de TNF α dans les milieux conditionnés de macrophages. De manière intéressante, ces CML induisent l'expression d'IL-1 β par les macrophages qui engendrerait à nouveau des signaux cellulaires favorisant la calcification des CML (Ikeda, Souma et al. 2012).

Au sein des vaisseaux sanguins, la perte d'activité ostéoclastique pourrait être un évènement favorisant le développement des calcifications artérielles (Massy, Mentaverri et al. 2008), (Doherty, Uzui et al. 2002). Il est clairement établi que 2 molécules sont indispensables et suffisantes à la différenciation ostéoclastique des macrophages: le MCSF et le RANKL (Udagawa, Takahashi et al. 1990). Tout d'abord, le MCSF est indispensable à la maturation des macrophages et induit les signaux responsables de la survie et la prolifération. La fixation du RANKL sur le récepteur RANK entraîne la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclaste. Dans ce système, l'ostéoprotégérine (OPG) est un récepteur leurre qui empêche la fixation du RANKL sur RANK en se liant au RANKL. L'OPG est donc un puissant inhibiteur de la formation des ostéoclastes. A l'inverse, l'OPG semble être un inhibiteur de calcifications vasculaires. En effet, des souris invalidées pour l'OPG présentent une ostéoporose sévère et des calcifications vasculaires. Le rôle central du RANKL dans la différenciation ostéoclastique met en avant l'importance des cellules produisant cette protéine.

Dans l'os, les cellules stromales et les ostéoblastes (cellules productrices du RANKL) sont les cibles des agents ostéoclastogéniques qui produisent leur effet en augmentant l'expression de RANKL et en modulant la balance OPG/RANKL. Par exemple, dans un contexte inflammatoire, le TNF α stimule les cellules ostéoblastiques qui en réponse augmentent leur expression de RANKL et de MCSF favorisant la différenciation des macrophages en ostéoclastes (Hofbauer, Lacey et al. 1999), (Kimble, Srivastava et al. 1996). Les CML sont capables de synthétiser du RANKL, ce qui pourrait stimuler le recrutement de monocytes qui se différencieraient ensuite en ostéoclastes. Il est montré que le MCSF est synthétisé dans les plaques d'athérosclérose par les cellules endothéliales, les CML ou encore les macrophages eux même. En 2015, une étude a montré la présence de cellules multinucléées exprimant la tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP, un marqueur d'ostéoclastes mûres) ainsi que d'autres marqueurs d'activité ostéoclastique (Cathepsine K, RANK et OPG) dans les plaques d'athérosclérose (Qiao, Mishra et al. 2015). Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour établir le rôle des ostéoclastes dans les calcifications vasculaires.

Apoptose et vésicules matricielles

La formation de la matrice osseuse nécessite du collagène de type I et de la phosphatase alcaline (ALP). Le collagène est naturellement présent au sein des artères, mais pas l'ALP. H. Clarke Anderson a été un des premiers à noter que des vésicules matricielles pourraient se former à partir de la membrane plasmique ou de cellules en cours de mort cellulaire pour donner naissance à des sites de nucléation (site initial pour la formation des calcifications). Il est maintenant établi que les CML et les macrophages participent à la calcification en formant des corps apoptotiques et en relarguant des vésicules matricielles semblables à celles retrouvées dans la formation des os. Ces vésicules sont pauvres en MGP, mais portent de l'ALP, des MMP et de l'annexine V qui vont favoriser le développement des calcifications en concentrant les cristaux d'hydroxyapatite (New and Aikawa 2013), (Kapustin, Davies et al. 2011), (Chen, O'Neill et al. 2008)). Ces mécanismes semblent impliqués dans les phases précoces pro-inflammatoires des calcifications, caractérisées par la formation de microcalcifications (Shanahan 2007).

Perte d'inhibition des inhibiteurs de minéralisation

Des mutations dans les gènes impliqués dans le métabolisme de l'adénosine (ENPP1, NT5E) peuvent également induire des pathologies vasculaires calcifiantes (Hofmann Bowman and McNally 2012). ENPP1 transforme l'ATP extracellulaire en AMP pyrophosphate qui joue un rôle prépondérant dans l'inhibition des cristaux de pyrophosphate (Ruf, Uhlenberg et al. 2005). Les patients atteints de ce type de mutation décèdent après seulement quelques jours de vie du fait des calcifications extrêmement sévères au niveau de l'aorte et des coronaires (Dlamini, Splitt et al. 2009). En amont d'ENPP1, NT5E transforme l'AMP en adénosine et phosphate inorganique et une mutation dans le gène codant pour cette protéine induit des calcifications artérielles massives au niveau des membres inférieurs (St Hilaire, Ziegler et al. 2011). Enfin, une mutation de ATP-binding cassette sub-family C member 6 (ABCC6) favorise également les calcifications héréditaires de l'arbre vasculaire en inhibant la synthèse hépatique de Matrix Gla Protein (MGP), un puissant inhibiteur de calcification (Li, Jiang et al. 2007). Dans la circulation sanguine, la Fétuine est une glycoprotéine complexée avec la MGP représentant un

puissant inhibiteur de calcification. Des souris génétiquement modifiées invalidées pour la Fétuine présentent des calcifications vasculaires et les taux sériques de Fétuine sont corrélés avec un risque cardiovasculaire augmenté (Schafer, Heiss et al. 2003), (Ketteler, Bongartz et al. 2003). L'ostéopontine est une autre protéine d'intérêt dans l'inhibition des calcifications en inhibant la croissance des cristaux d'apatite et en favorisant les fonctions ostéoclastiques *via* l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Des souris invalidées pour la MGP et l'ostéopontine présentent une calcification vasculaire plus rapide que les souris invalidées pour la MGP seulement (Speer, McKee et al. 2002). Un autre participant possible serait le fibroblast growth factor (FGF)-23. Ce facteur de croissance est sécrété par l'os en réponse à d'importants niveaux de phosphate (Shimada, Kakitani et al. 2004). Il agit alors sur le rein de façon à réduire la résorption du phosphate et il est maintenant connu qu'un déficit en FGF-23 est associé à une hyperphosphatémie chez des patients hémodialysés présentant des calcifications vasculaires (Inaba, Okuno et al. 2006). Dans ce système, Klotho, une protéine transmembranaire impliquée dans le contrôle du vieillissement, peut jouer le rôle de cofacteur du FGF-23. En effet, des souris déficientes pour Klotho présentent d'importantes calcifications vasculaires, ce qui était attribué à une accélération du vieillissement. Néanmoins, des souris FGF-23^{-/-} présentent le même phénotype, suggérant que la calcification serait modulée par l'hyperphosphatémie (Shimada, Kakitani et al. 2004).

II.4 Processus impliqués dans la calcification valvulaire

Comme dans le cas des calcifications vasculaires, plusieurs processus sont impliqués dans le développement des foyers de calcification au sein de la valve aortique. La minéralisation de la valve démarre au niveau de la fibrosa et s'étend ensuite dans le tissu en désorganisant l'architecture de la valve. Il est maintenant connu que l'endothélium exprime des gènes inhibant les processus de calcification. D'ailleurs, l'endothélium du versant aortique de la valve présente une expression de ces gènes anti-ostéogéniques plus faible en comparaison avec le versant ventriculaire. Par exemple, l'endothélium exprime moins d'OPG qui est un régulateur négatif de BMP-2 et RANKL. Les forces de cisaillement pourraient expliquer cette différence. En effet, il a été montré que des forces de cisaillement appliquées à des

cellules endothéliales modulent l'expression de plus de 1000 gènes et près de 30 miRNA (Holliday, Ankeny et al. 2011). Comme supposé dans les premières hypothèses de la survenue de la SVA, les forces de cisaillement semblent bien impliquées dans la dégénérescence fibro-calcique de la valve aortique.

Comme dans l'athérosclérose vasculaire, plusieurs études ont évalué le rôle des adipokines sur le développement de la SVA. Ces études relatant l'association entre les taux circulants de leptine et la présence d'une SVA montrent des résultats contradictoires. D'une part, Glader et al. ont observé des taux de leptine plus élevés chez les patients présentant une SVA par rapport à des sujets contrôles appariés sur l'âge et le sexe (Glader, Birgander et al. 2003). D'autre part, Kolasa-Trela et al. ont étudié des patients atteints de SVA sans autre pathologie cardiovasculaire associée et n'ont observé aucune différence dans les taux sériques de leptine entre ces 2 populations (n=74 pour chaque groupe) (Kolasa-Trela, Miszalski-Jamka et al. 2011). Dans un contexte athéroscléreux, il a été mis en évidence que des souris ApoE -/- recevant une injection quotidienne intra-péritonéale de leptine pendant 2 mois présentent une calcification significative de la valve aortique, avec une expression accrue de marqueurs de différenciation ostéoblastique (ostéocalcine et ostéopontine) (Zeadin, Butcher et al. 2009). En 2016, une étude a montré que la leptine est exprimée au sein des valves aortiques sténosées explantées d'une cohorte de 11 patients et que la leptine semblait induire des calcifications des VIC *in vitro* (Ben-Zvi, Savion et al. 2016).

Dans les valves pathologiques, il a été démontré que les VIC peuvent se différencier en au moins 2 différents phénotypes: VIC activées (aVIC) et VIC ostéoblastiques (obVIC) (Merryman, Lukoff et al. 2007), (Rajamannan, Subramaniam et al. 2003)). Les VIC peuvent se différencier en aVIC sous l'influence de cytokines proinflammatoires alors que le phénotype obVIC est obtenu après culture sous conditions procalcifiantes (Yip, Chen et al. 2009). Néanmoins, Monzack et al. ont démontré que même si les VIC cultivées en milieu procalcifiant présentent l'expression de marqueurs précoces de calcification (comme l'ALP ou RUNX2, suivant le processus de différenciation ostéoblastique), l'expression de marqueurs de calcification plus avancée (des protéines de la matrice osseuse comme

l'ostéocalcine) n'est pas retrouvée dans leur étude, posant la question de la différenciation totale des VIC en ostéoblaste (Monzack and Masters 2011).

Miller et al ont mis en évidence le rôle pro-ostéogénique des ROS dans le développement de la SVA (Miller, Chu et al. 2008). Leur étude a démontré que le peroxyde d'hydrogène généré en amont de la NO synthase jouait un rôle important dans la physiopathologie calcifiante de la valve. Ils ont également établi que les enzymes antioxydantes ayant pour rôle d'endiguer ce stress oxydatif étaient sous exprimées dans les valves sténosées. Il était par ailleurs déjà connu dans les CML que le peroxyde d'hydrogène activait RUNX2, Msx2 et la voie Wnt, favorisant alors la minéralisation (Byon, Javed et al. 2008), (Lai, Shao et al. 2012).

Comme abordé dans la partie I.2.1.3., une mutation dans le gène NOTCH1 est associée avec la bicuspidie aortique. Les récepteurs de cette famille mènent à l'expression de hairy repressors qui inhibent l'expression de BMP-2 et RUNX2 dans les VIC (Nigam and Srivastava 2009). La voie Wnt est également fortement impliquée dans la différenciation ostéoblastique des VIC. Il a été démontré que le ligand Wnt3a est surexprimé et induit la stabilisation de β -catenine, permettant la translocation dans le noyau et favorisant les processus de calcification. Plusieurs facteurs comme les cytokines proinflammatoires ou les LDL-oxydées peuvent induire l'expression de BMP-2 régulant l'expression de MSX2, un agoniste de la voie Wnt.

Des études récentes ont montré que les VIC en cours de différenciation peuvent sécréter des vésicules riches en ectonucléotidases qui induisent la nucléation des cristaux de calcium phosphate (Bertazzo, Gentleman et al. 2013), (Bouchareb, Boulanger et al. 2014). En parallèle de ces vésicules, les cellules en cours d'apoptose mènent à la production de corps apoptotiques présentant les mêmes propriétés que les microvésicules. L'apoptose des VIC est provoquée par différents stimuli tels que des cytokines, les ROS ou une altération de la signalisation purinergique. Ces corps apoptotiques servent alors de nid pour la formation de calcifications dystrophiques (Cote, El Husseini et al. 2012).

Dans la valve aortique, les processus de différenciation ostéoblastique et d'apoptose contribuent au processus de minéralisation *via* les ectonucléotidases (ALP, ENPP1,

NT5E) qui sont surexprimées dans les valves aortiques (Mahmut, Boulanger et al. 2015), (Mathieu, Voisine et al. 2005). Ces enzymes produisent des produits dérivés du phosphate à partir de nucléotides et nucléosides. L'ALP, par exemple, a une grande quantité de substrats parmi lesquels le pyrophosphate, une forme dérivée inhibant la calcification qui sera converti en phosphate, une forme favorisant les calcifications.

En résumé, les études réalisées ces dernières années ont montré que l'oxydation des lipides infiltrés dans la paroi valvulaire génère un processus inflammatoire qui à son tour active différentes voies de signalisation menant au remodelage fibrocalcique de la valve.

OBJECTIFS

L'athérosclérose et la sténose valvulaire aortique présentent donc de nombreuses similarités parmi lesquelles des processus physiopathologiques comme l'implication des dépôts lipidiques, l'inflammation, la fibrose l'angiogenèse et la calcification. Pour étudier ces systèmes, il est possible soit de travailler avec a priori, en choisissant une cible particulière car impliquée dans une partie de la physiopathologie par exemple, soit sans a priori, à partir de données de transcriptomique ou protéomique par exemple, permettant de mettre en évidence de nouvelles voies métaboliques et de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles spécifiques car tous les traitements de l'athérosclérose ont pour l'instant constitué des échecs dans le ralentissement de la SVA notamment.

Les monocytes/macrophages ont un rôle prépondérant dans la formation et le développement de la plaque d'athérosclérose. Les macrophages dérivés des monocytes localisés dans ces lésions présentent des phénotypes hétérogènes allant du macrophage M1 pro-inflammatoire classique, au macrophage M2 alternatif anti-inflammatoire et peuvent agir comme progéniteurs ostéoclastiques. Les calcifications vasculaires sont issues de processus identiques à ceux de la synthèse osseuse menant à des dépôts de cristaux de calcium phosphate dans les lésions athéroscléreuses avancées. L'implication indirecte des macrophages dans les processus de calcification vasculaire a été décrite auparavant. Néanmoins, à ce jour, les rôles directs de ces cellules dans la formation/dégradation de tissu osseux ectopique restent flous. Notre hypothèse est que les cellules présentes autour des calcifications sont des macrophages qui pourraient moduler directement les processus de calcification vasculaire. L'objectif de cette première étude est donc de caractériser *ex vivo* et *in vitro* le phénotype de ces macrophages et mieux comprendre le rôle de ces cellules dans la dégradation de ces calcifications.

Après l'étude des macrophages dans les calcifications vasculaires, nous avons analysé l'impact d'un facteur de risque de la SVA, l'obésité, sur la survenue des calcifications valvulaires et les effets de la leptine, adipokine sécrétée par le tissu adipeux blanc, sur la différenciation ostéoblastique des cellules interstitielles de valve. Ce travail fait suite à la description de l'association entre la leptine, le phénotype clinique et la morphologie de la plaque (Elkalioubie 2013) Dans notre étude de la leptine dans la SVA, les taux sériques cette adipokine sont connus pour

Objectifs

être un facteur de risque cardiovasculaire et il a déjà été démontré son implication dans les calcifications vasculaires par l'intermédiaire des CML. Notre hypothèse est que les taux sériques de leptine sont augmentés chez les patients présentant une SVA, que cette adipokine est présente au sein des valves aortiques sténosées et qu'elle peut induire l'expression d'acteurs ostéogéniques. Les objectifs de ce travail sont donc dans un premier temps, de doser la leptine sérique chez des patients présentant ou non une SVA, dans un second temps, d'analyser la présence de leptine dans les zones calcifiées et non calcifiées de valves aortiques humaines, et enfin, d'analyser les effets cellulaires de la leptine sur les VIC.

La troisième partie de ce travail est consacrée à l'analyse sans a priori du transcriptome des VIC. Il est important de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la formation et le développement des calcifications valvulaires menant à la SVA. Notre hypothèse est que l'acquisition d'un phénotype ostéoblastique par les VIC est une étape clé dans ce processus. L'objectif de cette étude est donc de mettre en évidence les différences phénotypiques entre les VIC contrôles et les VIC pathologiques. Ainsi dans cette étude, nous allons procéder à une analyse transcriptomique différentielle de VIC isolées de valves aortiques normales et sténosées. Grâce aux outils bioinformatiques, nous comptons mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés entre ces 2 populations cellulaires. Une fois notre cible sélectionnée et validée par PCR dans d'autres échantillons que ceux ayant servi à l'analyse transcriptomique, nous confirmerons son expression au sein du tissu valvulaire et après culture des VIC en conditions procalcifiantes.

Comprendre les événements cellulaires et moléculaires initiateurs de la formation des calcifications, les facteurs accélérant ce processus et, enfin, connaître précisément les phénotypes cellulaires impliqués dans la dégradation et la synthèse de la matrice calcifiée sont des éléments indispensables à la recherche de nouvelles thérapies dans ces pathologies cardiovasculaires fréquentes.

TRAVAUX DE RECHERCHE

Les macrophages alternatifs humains de type M2 peuplent les zones calcifiées des lésions athéroscléreuses et présentent une activité de résorption osseuse induite par le RANKL altéré

Human alternative M2 macrophages populate calcified areas of atherosclerotic lesions and display impaired RANKL-induced osteoclastic bone resorption activity

Article soumis à Circulation research

Daoudi M., Rosa M., Louvet L., Copin C., Fanchon M., Vanhoutte J., Derudas B., Belloy L., Eeckhoutte J., Haulon S., Zawadzki C., Susen S., Massy Z. A., Staels B., Chinetti-Gbaguidi G.

Résumé

Contexte – Les calcifications vasculaires sont issues de processus identiques à ceux de la synthèse osseuse menant à des dépôts de cristaux de calcium phosphate dans les lésions athéroscléreuses avancées. Les macrophages dérivés des monocytes, localisés dans ces lésions, présentent des phénotypes hétérogènes allant du macrophage M1 pro-inflammatoire classique, au macrophage M2 alternatif anti-inflammatoire et peuvent agir comme progéniteur ostéoclastique.

Objectif – Caractériser le phénotype des macrophages situés autour des zones riches en dépôts calciques dans les plaques humaines d'athérosclérose.

Méthodes et résultats – Les macrophages proches des dépôts calciques présentent un phénotype de macrophages alternatifs montrant l'expression du CD68 et du mannose receptor (MR). *In vitro* des macrophages alternatifs M2 différenciés en présence d'interleukine 4 (IL-4) sont caractérisés par une expression de la cathepsine K (CTSK) plus faible que dans les macrophages non polarisés (RM). De plus, malgré une expression plus forte du récepteur RANK, la voie de signalisation induite par le RANKL/MCSF et l'activation en ostéoclaste sont déficientes dans les macrophages M2, menant à une absence de capacité de dégradation osseuse. Ces résultats sont associés avec une expression plus importante d'inhibiteur de formation ostéoclastique B cell lymphoma 6 (Bcl6) et Interferon Regulatory Factor 8 (IRF8) ainsi qu'une expression moins importante d'un activateur transcriptionnel de la formation d'ostéoclastes, B-lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp1) dans les macrophages M2 par rapport aux RM. De plus, l'inhibition de l'expression de Blimp1 dans les RM diminue l'expression de la CTSK au niveau de l'expression retrouvée dans les macrophages M2.

Conclusion – Ces résultats indiquent que les macrophages entourant les zones de calcification des plaques d'athérosclérose humaine sont incapables de dégrader les dépôts calciques.

Mots clés : phénotype des macrophages, calcification vasculaire, athérosclérose

Introduction

Les calcifications vasculaires peuvent apparaître dans toutes les artères aussi bien dans l'intima que dans la média. Les calcifications intimes sont associées à l'inflammation et au développement de plaques et de lésions occlusives, alors que les régions adjacentes peuvent rester complètement normales. Cette forme intinale de calcification est un indicateur de stades avancés d'athérosclérose et peut se retrouver au sein de l'aorte, des artères coronaires et des autres artères de large calibre (Schiffrin, Lipman et al. 2007), (Kapustin and Shanahan 2009). Les calcifications vasculaires vont alors réduire l'élasticité artérielle portant atteinte à l'hémodynamique cardiovasculaire contribuant à l'hypertension, la sténose aortique et l'hypertrophie cardiaque (Giachelli 2004), (Speer and Giachelli 2004), (Niederhoffer, Marke et al. 1997). Enfin, il est établi que les calcifications vasculaires sont un facteur de risque indépendant de morbi-mortalité cardiovasculaire.

Les calcifications vasculaires sont maintenant reconnues comme un processus dynamique régulé et partageant de nombreux points communs avec la formation des os. L'hypothèse actuelle repose sur la balance entre les activités de type ostéoblastique et ostéoclastique, cette dernière empêchant les dépôts phosphocalciques dans les vaisseaux (Doherty, Asotra et al. 2003), (Yamanouchi, Takei et al. 2012). Les ostéoclastes sont de larges cellules multinucléées dérivant des précurseurs des monocytes/macrophages (Udagawa, Takahashi et al. 1990). La maturation de ces cellules est directement régulée par le MCSF et le RANKL produits essentiellement par les ostéoblastes dans l'os et par les CML dans la paroi artérielle sous certaines conditions (Suda, Takahashi et al. 1999), (Cardus, Panizo et al. 2007).

La présence à la fois de monocytes/macrophages qui sont capables de se différencier en ostéoclastes et des CML qui peuvent acquérir un phénotype ostéoblastique et sécréter les facteurs nécessaires à la différenciation des ostéoclastes dans la paroi artérielle suggèrent la présence d'ostéoclastes dans les lits artériels (Doherty, Asotra et al. 2003), (Massy, Mentaverri et al. 2008). D'ailleurs,

il a déjà été démontré que TRAP, un marqueur d'ostéoclastes matures, est exprimé au sein de plaques d'athérosclérose, mettant en évidence des cellules géantes multinucléées. Ainsi, la présence de macrophages ayant été décrite proche des zones de calcifications dans les plaques d'athérosclérose humaine (Nakamura, Ishibashi-Ueda et al. 2009), l'objectif de ce travail est de caractériser le phénotype fonctionnel de ces macrophages.

Résultats

Les macrophages localisés autour des zones calcifiées de plaques d'athérosclérose humaine sont des macrophages alternatifs CD68⁺MR⁺.

Sachant qu'il existe différentes sous-populations de macrophages dans les lésions athéroscléreuses humaines et que des macrophages sont présents en bordure des zones de calcifications, ce travail a pour but de caractériser les macrophages résidents proches des zones calcifiées. Ainsi, ces cellules CD68⁺ proches des zones calcifiées expriment fortement le marqueur de macrophages alternatifs MR.

Les macrophages alternatifs M2 présentent une altération du profil d'expression des marqueurs ostéoclastiques.

Les macrophages proches des zones de calcification étant CD68⁺MR⁺, le profil ostéoclastique de monocytes différenciés en M2 par l'IL-4 a été analysé. Ainsi, les macrophages de type M2 présentent une plus forte expression du marqueur d'ostéoclaste CA2, mais, de manière intéressante, une faible expression de la CTSK, que ce soit au niveau génique ou au niveau protéique comparé à des macrophages non polarisés (RM). Ce résultat est confirmé *ex vivo*, l'expression de la CTSK étant plus faible dans les zones riches en cellules CD68⁺MR⁺ en comparaison de cellules CD68⁺MR⁻ isolées de plaques d'athérosclérose humaines par microdissection laser. L'expression de NFATc-1, facteur de transcription essentiel à l'ostéoclastogenèse (Takayanagi, Kim et al. 2002) est plus faible dans les M2 par rapport aux RM. L'ensemble de ces résultats tend à montrer que les macrophages de type M2 polarisés par l'IL-4 *in vitro* présentent un phénotype ostéoclastique caractérisé néanmoins par une faible expression et activité de la CTSK.

Les macrophages de type M2 polarisés par l'IL-4 présentent une expression de RANK importante.

La différenciation ostéoclastique faisant intervenir la voie de signalisation RANK/RANKL, l'expression de RANK a été mesurée *in vitro*. Les macrophages polarisés en M2 par l'IL4 expriment RANK de façon plus importante que les RM, au niveau génique, et au niveau membranaire. De plus, *ex vivo*, l'expression de RANK est plus importante dans les zones riches en cellules CD68+MR+ retrouvées proches des calcifications et isolées par microdissection laser, en comparaison avec des cellules CD68+MR-.

L'activité ostéoclastique induite par RANKL/MCSF est déficiente dans les macrophages M2

RANK étant plus exprimé dans les macrophages polarisés en M2 par l'IL-4 par rapport aux RM, la réponse à l'activation ostéoclastique par le couple RANKL/MCSF a été étudiée. Les monocytes humains ont été différenciés pendant 6 jours en présence ou non de RANKL/MCSF, en présence ou non d'IL-4. Cette activation induit une augmentation significative de l'expression de la CA2, de TRAP, de NFATc-1 et de l'OPN dans les RM, mais pas dans les M2. De la même façon, la stimulation par RANKL/MCSF induit l'expression génique et l'activité de la CTSK uniquement dans les RM. Ces résultats montrent donc que malgré une plus forte expression basale de RANK, les macrophages alternatifs M2 répondent moins à l'activation par RANKL/MCSF que les RM.

Pour évaluer les conséquences fonctionnelles de la réponse réduite des macrophages M2 à la stimulation par RANKL/MCSF, des monocytes ont été placés sur des disques d'os bovin et différenciés pendant 14 jours en présence ou non d'IL-4 et de RANKL/MCSF. Le nombre de cellules matures, multinucléées et positives pour le marqueur de maturation ostéoclastique TRAP est beaucoup plus important chez les RM par rapport aux M2. La faculté des RM et des M2 à dégrader la matrice osseuse est significativement augmentée par le traitement RANKL/MCSF seulement dans les RM, indiquant que les macrophages de type M2 sont incapables de dégrader la matrice osseuse. De façon intéressante, ce phénotype observé dans les

Macrophages et calcifications vasculaires

M2 est comparable à celui d'ostéoclastes issus de souris déficientes pour le CTSK (Saftig, Hunziker et al. 1998). Ces données indiquent que l'expression et l'activité réduites de la CTSK dans les macrophages M2 sont un facteur déterminant dans l'incapacité de ces cellules à dégrader la matrice osseuse dans les conditions de différenciation ostéoclastique.

L'expression de Blimp1, régulateur de l'expression de la CTSK, est moins élevée dans les M2 que dans les RM.

Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse déficiente des M2 à l'activation par RANKL/MCSF, l'expression des régulateurs de la CTSK a été mesurée. Dans un premier temps, l'expression des 2 principaux inhibiteurs de la différenciation ostéoclastique et de la CTSK, à savoir Bcl6 (B-cell lymphoma 6) et IRF8 (Interferon Regulatory Factor-8) (Miyachi, Ninomiya et al. 2010), (Zhao, Takami et al. 2009) a été mesurée dans les RM et les M2. Les résultats montrent que ces 2 inhibiteurs sont significativement plus exprimés dans les macrophages M2 par rapport aux RM.

Dans un second temps, l'analyse des activateurs de la différenciation ostéoclastique a montré non seulement que l'expression de NFATc-1 est plus faible dans les M2 que dans les RM, mais également que l'expression de Blimp1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1), un répresseur transcriptionnel des régulateurs négatifs de l'ostéoclastogénèse, est fortement diminuée dans les M2 par rapport aux RM. Ces données indiquent donc que la machinerie transcriptionnelle menant à la différenciation ostéoclastique est inhibée dans les macrophages M2 par rapport aux RM.

Pour mieux comprendre son rôle, l'expression de Blimp1 a été inhibée par siRNA dans des RM stimulés par RANKL/MCSF. Inhiber l'expression de Blimp1 diminue l'expression de CTSK au niveau génique et protéique, mimant le phénotype observé dans les M2. Ce résultat suggère donc qu'un faible niveau d'expression de Blimp1 dans les macrophages M2 est responsable de l'expression altérée de CTSK dans ces cellules.

L'ensemble de ces résultats indique que le programme transcriptionnel régulant l'expression de la CTSK et donc l'activité ostéoclastique est altéré dans les macrophages M2 caractérisés par une faible expression des activateurs (NFATc-1 et Blimp1) et une forte expression des répresseurs de la différenciation ostéoclastique (Bcl6 et IRF8).

Discussion

Les processus menant aux calcifications vasculaires dans les lésions athéroscléreuses humaines suivent les mêmes voies de signalisation que celles rencontrées dans la formation de l'os (Zhao, Takami et al. 2009). De plus en plus d'études tendent à montrer que les calcifications vasculaires sont dues à des processus activement régulés et médiés par des cellules de type ostéoblastiques et ostéoclastiques. Enfin, les calcifications vasculaires sont associées au vieillissement et au remodelage artériel et représentent un facteur de risque indépendant de morbidité cardiovasculaire (Wilson, Kaupila et al. 2001), (Massy and Druke 2013), (Chiu, Adler et al. 2010).

Les ostéoclastes proviennent de cellules de la lignée hématopoïétique de moelle osseuse dérivées de précurseurs myéloïdes ou de monocytes circulants. Néanmoins, la présence d'ostéoclastes matures dans la paroi des vaisseaux est toujours controversée (Massy, Mentaverri et al. 2008), (Doherty, Uzui et al. 2002). Ainsi, dans les lésions athéroscléreuses, les macrophages exprimant à la fois les récepteurs au MCSF et au RANKL (Sherr, Rettenmier et al. 1985) peuvent être activés par les ligands produits par les cellules endothéliales, les CML et les monocytes/macrophages eux-mêmes pouvant mener à l'activation de la voie de différenciation ostéoclastique. Des cellules positives pour TRAP ont déjà été observées dans les lésions athéroscléreuses humaines (Bostrom, Rajamannan et al. 2011), (Jeziorska, McCollum et al. 1998). De plus, le marquage de la CA2 co-localise avec le CD68 dans les plaques d'athérosclérose (Oksala, Levula et al. 2010) et la CTSK est exprimée dans les macrophages de lésions avancées contribuant au remodelage tissulaire et probablement à la rupture de la plaque (Jaffer, Kim et al. 2007), (Lutgens, Lutgens et al. 2006). Ce travail montre que les macrophages présents proches des zones de calcification intimaux présentent un phénotype alternatif (CD68+MR+) (Chinetti-Gbaguidi, Baron et al. 2011), (Bories, Colin et al. 2013). Cette sous-population macrophagique est caractérisée par une expression et une activité diminuées de CTSK, phénotype retrouvé *in vitro* via la polarisation par l'IL-4.

Ces macrophages alternatifs présentent un phénotype particulier vis à vis des calcifications vasculaires : malgré l'expression de marqueurs ostéoclastiques tels que la CA2 et RANK, la réponse à la stimulation par le couple RANKL/MCSF est fortement altérée. En conséquence, les macrophages alternatifs M2 sont incapables de dégrader la matrice osseuse en réponse au RANKL/MCSF. De façon intéressante, ce phénotype rappelle celui observé dans les ostéoclastes issus de souris déficientes pour la CTSK (Saftig, Hunziker et al. 1998), suggérant que l'altération de l'expression de la CTSK est suffisante pour compromettre l'activité ostéoclastique.

Les effets de l'IL-4 sur la maturation des ostéoclastes ont été étudiés dans d'autres modèles et systèmes. Néanmoins, il est intéressant de noter que l'IL-4 peut inhiber la formation des ostéoclastes en empêchant l'induction de NFATc1 par RANKL de façon dépendante de la voie STAT6 (Cheng, Liu et al. 2011). Il a également été rapporté que l'IL-4 peut empêcher l'ostéoclastogenèse en inhibant l'activation de NF- κ B et la voie des MAP Kinases (Abu-Amer 2001), (Wei, Wang et al. 2002).

Ce travail met en évidence un nouveau mécanisme transcriptionnel par lequel l'IL-4 contrôle la maturation ostéoclastique de macrophages alternatifs. Ces macrophages expriment donc moins NFATc-1, mais également Blimp1, un autre activateur de la voie d'ostéoclastogenèse et répresseur de gènes inhibant ce processus (Martins and Calame 2008). L'inhibition de l'expression de Blimp1 dans les RM a montré que Blimp1 est un facteur essentiel dans le contrôle de l'expression de la CTSK. En parallèle, l'expression de répresseurs de l'ostéoclastogenèse est augmentée dans les macrophages M2 par rapport aux RM. Enfin, malgré une expression basale de RANK plus importante que dans les RM, la réponse au RANKL/MCSF est atténuée dans les M2, suggérant une régulation différentielle en aval de l'interaction RANKL/MCSF-RANK.

L'accumulation de macrophages M2 autour de calcifications pourrait être une conséquence de leur incapacité à résorber les calcifications préexistantes, issues possiblement de l'apoptose des CML différenciées en cellules ostéoblastiques (Clarke, Littlewood et al. 2008). Une autre explication pourrait être que les calcifications apparaissent en conséquence de cette incapacité des M2 résidents à

prendre en charge les dépôts calciques. Les macrophages M2 ont déjà été décrits dans des zones caractéristiques des plaques telles que les zones de néo-vascularisation ou les zones hémorragiques (Bories, Colin et al. 2013), (Finn, Nakano et al. 2012), (Takayanagi, Kim et al. 2002). Ainsi, il apparaît important de mieux comprendre les signaux entraînant l'accumulation et la polarisation des macrophages dans ces zones particulières des lésions athéroscléreuses. Cette faible expression de CTSK, protéine impliquée dans la déstabilisation de la plaque, par les macrophages entourant les zones de calcification, appuie le rôle des macrophages M2 dans la stabilité de la plaque.

Les calcifications vasculaires ne régressent que rarement, les perspectives thérapeutiques sont donc la prévention et la stabilisation des calcifications préexistantes. Les traitements pour le moment reposent sur la prévention de l'athérosclérose par des molécules hypolipémiantes, le traitement de l'obésité ou de diabète, l'arrêt du tabac, l'activité physique. C'est pourquoi une approche permettant de moduler le phénotype des macrophages impliqués dans les calcifications vasculaires pourrait constituer une alternative thérapeutique permettant la prévention/stabilisation des dépôts calciques.

La leptine induit la différenciation ostéoblastique des cellules interstitielles de valve aortique *via* les voies de signalisation Akt et ERK

Leptin induces osteoblast differentiation of human valvular interstitial cells via the Akt and ERK pathways

Article soumis à l'International Journal of Cardiology

Mickael Rosa^a, Camille Paris^{a, b}, Yoann Sottejeau^a, Delphine Corseaux^a, Emmanuel Robin^{a, b}, Madjid Tagzirt^a, Francis Juthier^{a, b}, Ramadan Jashari^c, Antoine Rauch^{a, b}, André Vincentelli^a, Bart Staels^a, Eric Van Belle^{a, b}, Sophie Susen^{a, b*}, Annabelle - Dupont^{a, b}

Résumé

Contexte: La sténose valvulaire aortique (SVA) touche 2 à 6% des personnes âgées de plus de 65 ans et résulte en partie de la différenciation ostéoblastique des cellules interstitielles de valves humaines (VIC). Ce travail a pour but d'étudier les effets de la leptine sur le phénotype ostéoblastique des VIC ainsi que les voies de signalisation impliquées dans ces processus.

Méthodes: Des patients atteints de SVA opérés pour un remplacement valvulaire aortique (n=43) ont été inclus dans cette étude. Des patients avec une pathologie coronaire sans SVA (n=129) servent de population contrôle. La leptine a été dosée dans les broyats de valves aortiques sténosées et dans le sang des patients. L'expression du récepteur a été étudiée dans les valves aortiques et dans les VIC isolées. Les effets de la leptine sur la différenciation ostéoblastique des VIC ont été mis en évidence par dosage de l'activité phosphatase alcaline (ALP) et par analyse en RT-qPCR de l'expression génique de l'ostéopontine, de l'ALP, de la BMP-2 et de RUNX2.

Résultats: Les patients présentant une SVA avaient des taux sériques de leptine plus élevés que les patients du groupe coronaire (p=0.002). La leptine était présente dans les valves aortiques sténosées, à des concentrations plus importantes dans les zones calcifiées par rapport aux zones non calcifiées (p=0.01). Le traitement chronique des VIC par de la leptine augmentait l'activité phosphatase alcaline ainsi que l'expression de l'ALP, de la BMP-2 et de RUNX2 et une diminution d'expression de l'ostéopontine. De plus, l'inhibition pharmacologique des voies de signalisation Akt et ERK pendant le traitement par la leptine diminuait l'expression des marqueurs ostéoblastique des VIC.

Conclusions: L'ensemble de ces résultats indique que la leptine joue un rôle critique dans le développement de la SVA en favorisant la différenciation ostéoblastique des VIC *via* les voies de signalisation Akt et ERK. Ce travail apporte de nouvelles pistes sur le développement de la physiopathologie de la SVA et suggère qu'une diminution

des taux circulants de leptine ou le blocage des effets cellulaires de la leptine pourraient être des stratégies thérapeutiques prometteuses dans la SVA.

Introduction

La sténose valvulaire aortique est la pathologie valvulaire la plus commune chez les adultes, touchant 2 à 6% des personnes âgées de plus de 65 ans (Nishimura, Otto et al. 2014). La SVA est une pathologie de type athéroscléreuse médiée par des interactions complexes entre les processus inflammatoires, les dépôts lipidiques, la fibrose et la calcification (Yetkin and Waltenberger 2009). Les cellules interstitielles de valve (VIC) sont la population cellulaire la plus présente dans les valves aortiques et jouent un rôle majeur dans l'homéostasie tissulaire et la fonction valvulaire (Taylor, Batten et al. 2003).

La leptine, produit du gène Ob, est une adipokine de 16 kDa (Auwerx and Staels 1998). Étudiée pour son rôle central sur le contrôle de la satiété, de nombreuses études ont rapporté des effets pléiotropes de la leptine et l'hyperleptinémie est clairement identifiée comme un facteur de risque de pathologie cardiovasculaire comme la maladie coronaire (Payne, Kohr et al. 2012, Elkalioubie, Zawadzki et al. 2013). Chez l'Homme, 2 principales isoformes sont exprimées. L'isoforme longue participe à la transduction des signaux alors que l'isoforme courte, sans effet majeur dans la signalisation cellulaire, est impliquée dans le transport et la dégradation de la leptine (Singh, Bedi et al. 2010). En 2009, Zeadin et al ont montré qu'un traitement chronique par de la leptine de souris ApoE^{-/-} augmente les calcifications valvulaires et favorise la différenciation ostéoblastique des CML en culture (Zeadin, Butcher et al. 2009, Zeadin, Butcher et al. 2012).

De plus, une étude de 2016 a décrit que la leptine est exprimée dans les valves aortiques calcifiées et augmente les calcifications de VIC humaines en culture (Ben-Zvi, Savion et al. 2016). Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus restent à élucider. Les buts de ce travail sont 1) étudier l'association entre la leptine sérique circulante, la présence d'une SVA, la concentration de la leptine et de ses récepteurs dans les zones calcifiées et non calcifiées des valves aortiques des patients opérés et 2) mettre en évidence les effets de la leptine sur la différenciation ostéoblastique des VIC et les voies de signalisation impliquées.

Résultats

Les patients atteints de SVA présentent des taux sériques de leptines plus élevés

Le groupe SVA est composé de 24 hommes et 19 femmes âgés de 46 à 84 ans. Le groupe contrôle est constitué de 129 patients appariés sur l'âge et le sexe. Les patients SVA ont un IMC plus élevé que les patients du groupe contrôle. Pour les paramètres diabète, dyslipidémie, hypertension et médicaments, aucune différence n'est observée entre les 2 groupes. Les patients SVA ont des concentrations de leptine sérique significativement plus élevées que les patients du groupe contrôle ($p=0,002$).

Les niveaux de leptine et de ses récepteurs sont plus élevés dans les zones calcifiées que dans les zones non calcifiées des valves aortiques sténosées

Les concentrations de leptine dans les valves sont plus élevées dans les broyats de zones calcifiées par rapport aux zones non calcifiées (229 ± 38 vs 121 ± 20 pg/mg de protéines, $p=0,01$). De plus, les concentrations valvulaires de leptine (que ce soit pour les zones calcifiées ou les zones non calcifiées) sont fortement et positivement corrélées aux taux de leptine retrouvés dans le sérum de ces patients.

La leptine exerçant ses effets *via* ses récepteurs ObR-L et ObR-S, l'expression de ces deux isoformes a été analysée dans les broyats valvulaires des zones calcifiées et non calcifiées. L'expression d'ObR-L est 11 fois plus importante dans les zones calcifiées par rapport aux zones non calcifiées. ($0,69 \pm 0,18$ vs $0,06 \pm 0,02$, $p<0,0001$).

La leptine favorise le phénotype ostéoblastique des VIC de manière leptine dépendante des voies Akt et ERK

Comme les VIC expriment les isoformes courte et longue du récepteur à la leptine, nous avons testé si la leptine peut favoriser le phénotype ostéoblastique des VIC.

Leptine et sténose valvulaire aortique

Les cellules sont cultivées en milieu de différenciation ostéoblastique supplémenté ou non par de la leptine (0,06 ou 0,3 μ M) pendant 21 jours. L'axe Leptine/récepteur est connu pour activer les voies PI3K/Akt et MAPK. Le potentiel rôle de ces voies dans l'induction du phénotype ostéoblastique des VIC *in vitro* a été étudié à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de Akt et ERK. L'activité ALP est induite par la leptine de façon dose dépendante par rapport à des cellules en milieu de différenciation seul ($p=0,004$ pour chaque condition). Cette augmentation est inhibée par les 2 inhibiteurs ($p=0,015$ pour les 2 conditions). De plus, le traitement par la leptine module l'expression de gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique. Après 21 jours de culture en présence de 0,06 et 0,3 μ M de leptine, l'expression génique de l'ALP était augmentée 3 et 4 fois respectivement par rapport à des cellules non stimulées par la leptine ($p=0,001$ et 0,002). L'expression de RUNX2 est augmentée de façon dose-dépendante (1,5 et 1,8 fois) ($p=0,016$ pour les 2 conditions). En accord avec ces résultats, l'induction de l'ALP et de RUNX2 est dépendante de Akt et ERK (respectivement, $p=0,002$ et 0,003 pour l'expression de l'ALP et $p=0,031$ pour les 2 inhibiteurs pour l'expression de RUNX2). L'expression de BMP-2 est augmentée uniquement quand les cellules sont stimulées par 0,3 μ M de leptine ($p=0,004$) et cette augmentation est empêchée par l'inhibition de ERK seulement. ($p=0,031$). Enfin, l'expression de l'ostéopontine, un inhibiteur des processus de calcification, est diminuée de plus de 40% en présence de 0,06 et 0,3 μ M de leptine ($p=0,0005$ et $p=0,0034$ respectivement). L'inhibition d'Akt ou ERK empêchait cette diminution d'expression ($p=0,031$ pour les 2 conditions).

Discussion

Cette étude montre que la leptine libre sérique est plus élevée chez les patients atteints de SVA par rapport au groupe contrôle qui est apparié sur l'âge et le sexe. Ce premier résultat suggère que la leptine pourrait contribuer directement à la dégénérescence de la valve. Seulement 2 études ont discuté d'une association entre la leptine circulante et la SVA. Glader *et al.* ont observé des taux de leptine plus élevés dans le plasma de 102 patients atteints de SVA en comparaison avec des sujets sains appariés sur l'âge et le sexe (Glader, Birgander et al. 2003). Néanmoins, la population de patients sténosés présentait une forte prévalence de pathologies cardiovasculaires concomitantes, notamment une maladie coronarienne observée chez 66% des patients. Des études plus anciennes ont montré que ces pathologies sont associées à des taux de leptine augmentés (Payne, Kohr et al. 2012, Shanker, Rao et al. 2012, Elkalioubie, Zawadzki et al. 2013). Kolasa-Trela *et al.*, d'autre part, ont étudié des patients atteints de SVA sans autre pathologie cardiovasculaire et n'ont observé aucune différence dans les taux de leptine circulante, sans différence avec le groupe contrôle (74 patients par groupe) (Kolasa-Trela, Miszalski-Jamka et al. 2011). La différence observée dans notre étude entre les 2 groupes de patients est associée à un IMC plus élevé chez les patients atteints de SVA. Il est maintenant établi que les taux de leptine sont augmentés chez des patients obèses et sont directement corrélés avec l'IMC.

Récemment, Ben-Zvi et al. ont montré que la leptine est exprimée dans la valve aortique explantée d'une cohorte de 11 patients tout venant présentant une SVA (Ben-Zvi, Savion et al. 2016). Notre étude, basée sur une cohorte de 43 patients présentant une SVA sans autre pathologie cardiovasculaire, confirme la présence de leptine dans les valves aortiques avec des taux plus élevés dans les zones calcifiées. Une forte corrélation entre les taux sériques de leptine et la concentration de leptine valvulaire suggère au moins en partie que la présence de leptine pourrait provenir du flux sanguin (Michel, Thauvat et al. 2007). De plus, nos résultats soulignent pour la première fois l'expression des isoformes courte et longue du récepteur dans les valves aortiques humaine sténosées. ObR-L est connu pour être exprimé dans de nombreux tissus humains comme la paroi artérielle normale ou les

lésions athéroscléreuses (Parhami, Tintut et al. 2001, Schroeter, Schneiderman et al. 2007). Nos résultats ont permis de démontrer que l'expression d'ObR-L est plus importante dans les zones calcifiées des valves sténosées, comme observé dans la maladie coronarienne (Parhami, Tintut et al. 2001, Zeadin, Butcher et al. 2009).

Notre étude complète ce qui est connu dans la littérature en montrant que la stimulation par la leptine augmente la différenciation ostéoblastique des VIC isolées de valves aortiques sténosées et met en évidence les voies de signalisation par lesquelles la leptine joue son rôle sur les VIC (Ben Zvi 2016, Zeadin 2009).

La stimulation des VIC par la leptine induit l'expression de marqueurs ostéoblastiques comme l'ALP, la BMP-2 et RUNX2 de façon dose dépendante. Une étude précédente a montré que la BMP-2 est présente dans les valves aortiques sténosées, mais cette expression n'est pas retrouvée au sein de valves normales (Kaden, Bickelhaupt et al. 2004, Gomez-Stallons, Wirrig-Schwendeman et al. 2016). Il a aussi été rapporté que la leptine augmente l'activité ostéoinductive de la BMP-2 dans un modèle murin (Xu, Wu et al. 2010). De plus, il est bien décrit que RUNX2 est le facteur de transcription clé dans la différenciation ostéoblastique (Rusanescu, Weissleder et al. 2008) et que l'ALP module les processus de différenciation et entraîne la production d'ions phosphates impliqués dans la formation de cristaux de calcium-phosphate (Bobryshev, Orekhov et al. 2014). Enfin, nous avons observé une diminution d'expression d'ostéopontine dans les VIC humaines stimulées par la leptine. L'ostéopontine est connue pour avoir des effets antinomieques sur la calcification par sa capacité à fixer les cristaux d'hydroxyapatite avec une forte affinité, mais possède aussi un fort potentiel d'inhibition des calcifications vasculaires (Speer, Chien et al. 2005, Cho, Cho et al. 2009).

Pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels la leptine et la calcification des VIC sont reliés, nous avons évalué la signalisation induite par le traitement par la leptine. Ainsi, dans cette étude, nous avons observé que la stimulation par la leptine module l'activité ALP, l'expression de RUNX2 et de l'ostéopontine de façon dépendante d'Akt et ERK. Ces 2 voies de signalisation sont connues pour jouer un rôle critique dans la différenciation ostéoblastique des VIC et les calcifications valvulaires (Choi, Kim et al. 2014, Yuan, Zhou et al. 2015). De plus, il est bien documenté que l'isoforme longue du récepteur à la leptine, peut être responsable de

la transduction de signaux à travers l'activation d'Akt et ERK dans les CML (Chavez, Haney et al. 2012, Liu, Liang et al. 2013).

Certaines limites sont à souligner dans cette étude. Tous les patients inclus dans l'étude présentent des formes sévères de la pathologie valvulaire aortique. Ainsi, nos résultats peuvent ne pas être représentatifs de phases plus précoces du développement de la SVA. Ensuite, les concentrations de leptine utilisées *in vitro*, sélectionnées sur base de précédentes études sur la leptine et ses effets sur la calcification des cellules vasculaires, pourraient être différentes des concentrations locales retrouvées au sein du tissu valvulaire (Parhami, Tintut et al. 2001, Zeadin, Butcher et al. 2012).

Notre étude démontre donc que les patients atteints de SVA présentent des taux sériques de leptine plus élevés que les patients du groupe contrôle. Nous mettons également en évidence que les VIC humaines expriment l'isoforme longue du récepteur. Pour finir, nos résultats montrent que la leptine favorise la différenciation ostéoblastique des VIC de manière dépendante des voies Akt et ERK. Cette étude suggère que la diminution des taux sériques de leptine ou l'inhibition de l'action de la leptine sur les VIC pourraient constituer des stratégies prometteuses dans le traitement de la SVA.

Rôle de l'aldéhyde déshydrogénase 1A1 dans la sténose valvulaire aortique: Implication de l'acide rétinoïque dans la différenciation ostéoblastique des cellules interstitielles de valve

Role of ALDH1A1 in the development of AVS : implication of retinoic acid signaling in the commitment of human VIC to a fibro-calcifying phenotype

Mickael Rosa, Yoann Sottejeau, Maxime Hervault, Ramadan Jashari, Delphine Corseaux, Madjid Tagzirt, Francis Juthier, André Vincentelli, Eric Van Belle, Annabelle Dupont, Bart Staels, Sophie Susen

Introduction

Face au problème de santé publique que constitue la SVA avec le vieillissement de la population, il est important de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans cette pathologie afin de proposer des nouvelles alternatives thérapeutiques dans la prise en charge de ces patients. Afin d'identifier de nouveaux processus physiopathologiques, il est possible de suivre une approche globale, sans a priori en réalisant une étude transcriptomique en « génome entier » par puces à ADN ou DNA micro-array. Cette approche a ainsi permis d'aboutir à de nouveaux biomarqueurs diagnostiques et pronostiques et cibles thérapeutiques innovantes dans de nombreuses pathologies, notamment dans le domaine cardiovasculaire (Plump and Madwed 2011). A ce jour, cette démarche a été appliquée dans le cadre de la SVA sur des valves de souris génétiquement invalidées pour la protéine Klotho versus wild type (Wirrig, Gomez et al. 2015) et sur des VIC dans le cadre d'un modèle porcin d'hypertension artérielle (Warnock, Nanduri et al. 2011). Une équipe a rapporté son utilisation dans la SVA pour analyser des broyats de valves aortiques humaines contrôles et sténosées (Bossé, Miqdad et al. 2009, Derbali, Bossé et al. 2010, Côté, El Husseini et al. 2012, El Husseini, Boulanger et al. 2014, Mahmut, Boulanger et al. 2014) et enfin une équipe a étudié le transcriptome de VIC en culture (VIC aux passages 3 à 6) (Yao, Song et al. 2015).

Au cours de cette thèse, nous avons donc décidé de réaliser une analyse transcriptomique sur des cellules isolées de valves aortiques normales et sténosées et d'étudier les hypothèses qu'elle permettrait de générer.

Méthodes

Analyse transcriptomique

Les VIC sont isolées par digestion par la collagénase de type I des cuspidés valvulaires (0,3%, 120 minutes, 37°C sous agitation constante). Les cellules sont ensuite cultivées dans une boîte de culture de 25 cm² (Becton Dickinson, NJ, Etats-Unis), en présence de milieu de culture Smooth Muscle Cell Basal Medium 2

Analyse transcriptomique et rôles de l'ALDH1A1/Acide rétinoïque dans la SVA

(Promocell, Heidelberg, Allemagne) supplémenté en facteurs de croissance : hEGF (human Epidermal Growth Factor), 0,5 ng/ml ; hbFG (human basic Fibroblast Growth Factor), 2ng/ml ; insuline, 5 ng/mL, sérum de veau foetal (SVF) 5% (Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 Supplement Pack, Promocell), et en antibiotiques : pénicilline-streptomycine, 2% et fungizone, 1% (Life Technologies, Carlsbad, Etats-Unis). Les cellules sont alors incubées à 37°C sous 5% de CO₂. Le milieu de culture est remplacé tous les 2 à 3 jours et le passage des cellules est réalisé lorsque leur confluence atteint 80-90%. Toutes les expériences sont réalisées sur des cellules provenant des passages 3-4.

Pour l'analyse transcriptomique, l'ARN extrait de VIC en culture (kit RNeasy micro kit, Qiagen) sera amplifié et marqué par la biotine puis déposé sur des puces Affymetrix HG-U133 plus 2 à la plateforme d'analyse transcriptomique de l'UMR 1011. Les logiciels d'analyse bioinformatique «GeneSpring®», «Partek®» et «David» seront utilisés pour interpréter les résultats et identifier les gènes différentiellement exprimés entre les VIC issues de valves contrôles et celles de valves pathologiques.

Validation des résultats

Les résultats obtenus en transcriptomique sont vérifiés par qPCR. Les ARN sont extraits par la méthode phénol-chloroforme décrite par Chomczynski and Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987). Brièvement, 2 microgrammes d'ARN total sont retro-transcrits en ADN complémentaire par le High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies) en suivant les recommandations du fournisseur. Les ADNc sont alors conservés à -20°C. La qPCR est réalisée sur 4 µl d'ADNc qui ont été ajoutés à 1 µl de mix contenant les amorces sens et anti-sens et la sonde TaqMan®, spécifiques du gène d'intérêt (Life Technologies), 10 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix contenant l'enzyme Taq polymérase, le tampon MgCl₂ et les dNTP (Life Technologies) et 5 µl d'eau (volume final de 20 µl). L'expression des transcrits est normalisée par le gène de ménage Abelson (ABL) (Ipsogen, Marseille, France). L'analyse des résultats se fait selon la méthode de comparaison des seuils critiques (critical threshold, Ct) calculés avec la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

La cible sélectionnée sera ensuite analysée au niveau génique et protéique après culture en milieu procalcifiant (DMEM supplémenté en SVF 10%, en antibiotiques : pénicilline-streptomycine, 2% et fungizone, 1%, acide ascorbique 283 µM, phosphate 3 mM, Dexaméthasone 100 nM). En résumé, après dosage des extraits protéiques par le test BCA (kit BiCinchoninic Assay, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) 10 µg d'extraits protéiques sont dilués dans une solution dénaturante commerciale (Thermo Fisher Scientific). Après dénaturation à 95°C, les échantillons sont déposés dans un gel Nu-PAGE Novex 4-12% Bis-Tris (Thermo Fisher Scientific). La migration s'effectue pendant 45 minutes à 200 V dans un tampon de migration MES 1X (Thermo Fisher Scientific). Les protéines sont transférées en 7 min sur une membrane de nitrocellulose grâce au système iBlot® 2 Gel Transfer Device (Thermo Fisher Scientific) selon les instructions du constructeur. Après une étape de saturation de la membrane par une solution de lait 5% dans du Tris Buffer Saline – Tween 20 (TBS-T), la membrane est incubée avec l'anticorps primaire une nuit à 4°C sous agitation. L'anticorps primaire est ensuite éliminé par 3 lavages successifs au TBST. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase, sous agitation, à température ambiante, pendant 1h. Après 3 lavages, les protéines sont révélées par chimiluminescence (Pierce®ECL Western Blotting Substrate, Life Technologies). L'acquisition et le traitement des images se fait *via* une GBox (Syngene, Frederick, MD, Etats-Unis) et le logiciel GeneSnap (Syngene)

Histologie et immunohistochimie

Une fois la valve nettoyée de toute calcification, elle est plongée dans une solution de paraformaldehyde (PFA) à 4% pendant 24h à 4°C pour permettre la fixation des tissus. L'échantillon de valve est alors placé dans une solution de sucrose à 30% pendant 24h. Le prélèvement est ensuite inclus dans une cupule remplie d'OCT, refroidi dans l'isopentane froid. L'échantillon est conservé à -80°C jusqu'à la réalisation des coupes histologique de 10 µm. Ces coupes sont ensuite conservées à -20°C jusqu'aux expériences de coloration ou d'immunomarquage. L'expression de l'ALDH1A1 est évaluée par immunomarquage sur 5 valves pathologiques et 5 valves normales (ab23375, Abcam).

Stimulation des VIC par l'acide rétinoïque

Quatre cultures de VIC pathologiques ont été cultivées pendant 14 jours en milieu standard et en milieu procalcifiant en absence ou présence d'acide rétinoïque (0 ; 10 ; 100 ; 1000 nM).

Pour chaque condition, 100 µl de TRIzol sont ajoutés par puits. L'expression des gènes est enfin analysée par RTqPCR quantitative en chimie TaqMan.

Pour mettre en évidence les calcifications macroscopiques, les cellules sont colorées au rouge alizarine. Après 14 jours de culture, les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS et fixées par du paraformaldéhyde pendant 15 minutes à température ambiante. La coloration est réalisée avec du rouge alizarine (2%, pH 4-4.3) pendant 3 min suivie de 3 lavages à l'eau distillée avant de prendre les photographies des résultats.

Résultats de l'analyse transcriptomique

Avant de pouvoir procéder à l'analyse transcriptomique, les RNA integrated numbers (RIN) permettant d'évaluer la qualité des ARN des VIC en culture ont été analysés. Les résultats sont regroupés dans le Tableau IV

Tableau IV : Cultures primaires de VIC analysées en transcriptomique

Culture	Valve aortique	Age	Sexe	RIN
TEM 26	Témoin	52	H	9,9
TEM 27	Témoin	37	F	9,6
TEM 28	Témoin	44	H	10
TEM 31	Témoin	45	H	10
TEM 36	Témoin	53	F	9,4
VIC 107	Sténosée tricuspide	51	H	10
VIC 108	Sténosée tricuspide	79	F	9,7
VIC 148	Sténosée tricuspide	70	F	9,8
VIC 152	Sténosée tricuspide	63	F	10
VIC 153	Sténosée tricuspide	80	H	9,6

En culture, les VIC issues de valves aortiques contrôles ou pathologiques, présentent de RIN supérieurs à 7, permettant donc l'analyse transcriptomique.

L'analyse transcriptomique a permis de générer un grand nombre de données. La figure 2 est un diagramme représentant les gènes spécifiquement exprimés par les VIC contrôles (359) et pathologiques (264), ainsi que les gènes exprimés par les deux populations cellulaires (21813).

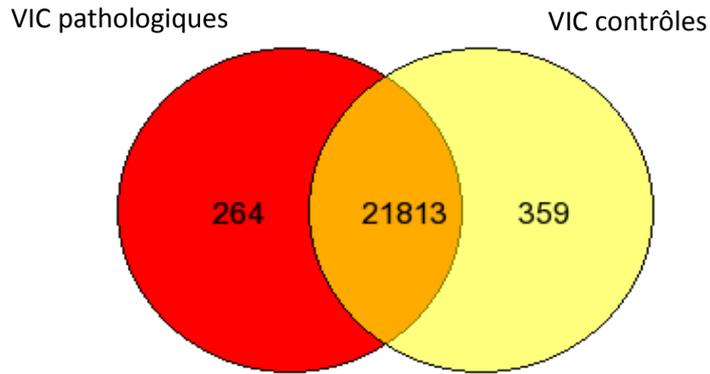


Figure 18 : Diagramme de Venn. En rouge, les gènes exprimés exclusivement par les VIC pathologiques ; en jaune, les gènes exprimés exclusivement par les VIC contrôles ; en orange, les gènes exprimés dans les deux populations

La figure 19 montre un « Volcano plot ». Les gènes sont distribués selon leur taux de variation en abscisse et leur différence statistique d'expression en ordonnée.

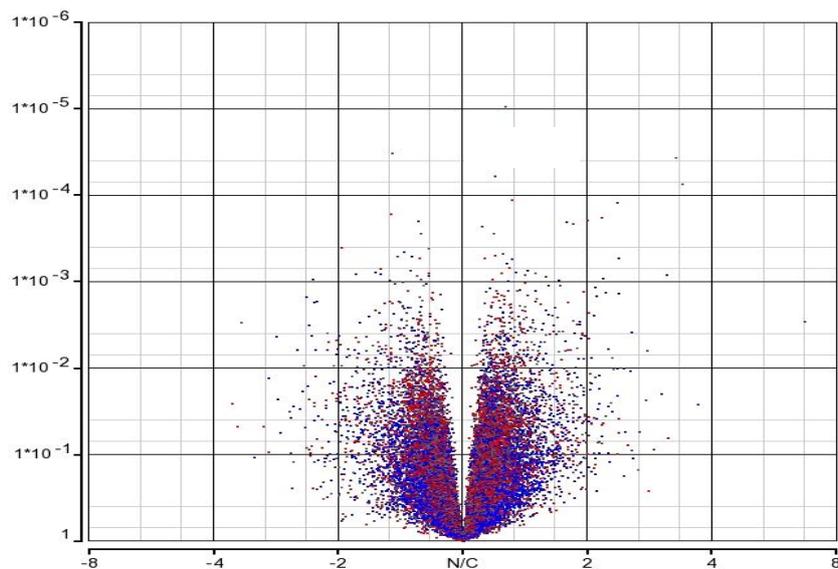


Figure 19 : Volcano plot des gènes différentiellement exprimés entre VIC pathologiques et VIC contrôles. Les gènes sont triés en fonction de leur Fold-change (en abscisse) et de leurs différences statistiques d'expression (p value) en ordonnée.

Afin de valider notre modèle, nous avons vérifié dans ces résultats l'expression de gènes impliqués dans les processus de calcification et d'angiogenèse. Malgré la culture *in vitro* les VIC pathologiques présentent toujours un profil en faveur des processus de calcification et d'angiogenèse (Figure 20).

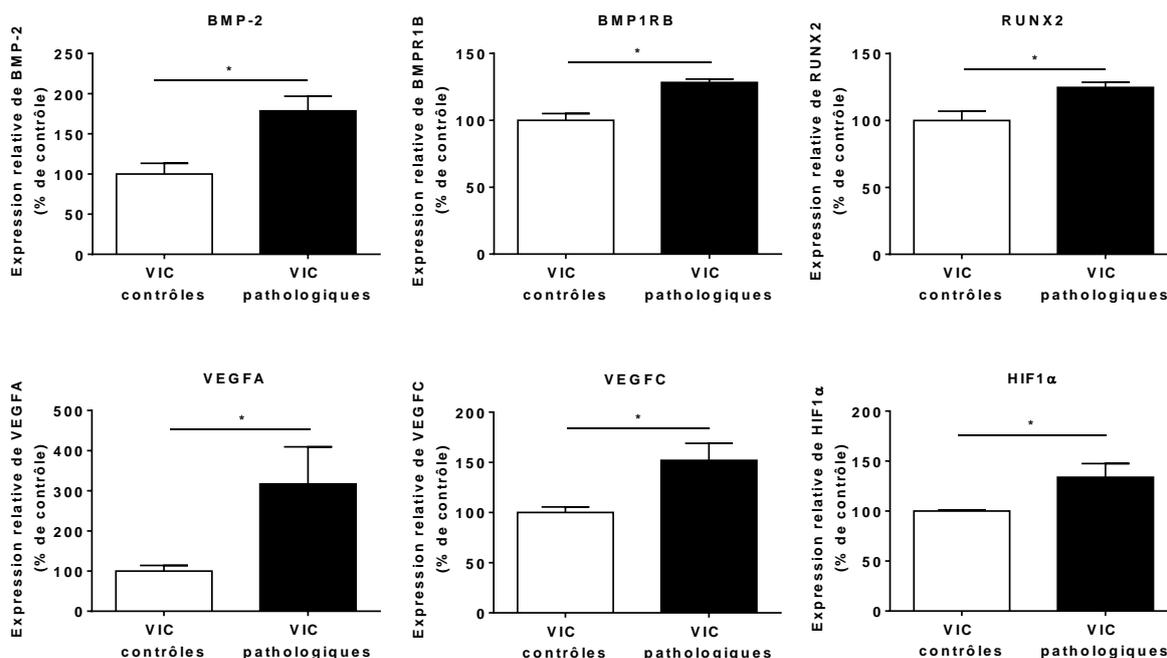


Figure 20 : Validation en RT-qPCR des résultats obtenus par l'analyse transcriptomique, comparaison de l'expression de gènes cibles entre VIC contrôles et VIC pathologiques. * : p<0,05

Le modèle et la technique ainsi validés, l'analyse s'est alors portée sur les gènes présentant une différence d'expression significative ($p < 0,05$) et un rapport de variation supérieur à 2. Les gènes les plus différenciellement exprimés sont listés dans les tableaux V (sur-régulés dans les VIC pathologiques par rapport aux VIC contrôles) et VI (sous-régulés).

Tableau V : Liste des gènes surexprimés dans les VIC pathologiques par rapport aux VIC contrôles

	Gene assignment	Gene symbol	p-value	FC
UP	RAB27B, member RAS oncogene family	RAB27B	0,0029	6,73363
	Leukemia inhibitory factor	LIF	0,0232	2,77625
	DNA-damage-inducible transcript 3	DDIT3	0,0014	2,38293
	Regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	RGS2	0,0005	2,37713
	Interleukin 36, beta	IL36B	0,0104	2,31189
	G protein-coupled receptor 1	GPR1	0,0255	2,28538
	microRNA 3189	MIR3189	0,0354	2,21369
	Cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	CTH	0,0009	2,1896
	microRNA 221	MIR221	0,0427	2,18844
	Thymic stromal lymphopoietin	TSLP	0,0002	2,17565

Tableau VI : Liste des gènes sous-régulés dans les VIC pathologiques par rapport aux VIC contrôles

	Gene assignment	Gene symbol	p-value	FC
DOWN	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	ALDH1A1	0,0259	-3,59246
	Angiopoietin 2	ANGPT2	0,0472	-3,51083
	cell adhesion molecule 3	CADM3	0,0043	-2,81088
	liver carboxylesterase 1-like	LOC100653057	0,0319	-2,62061
	cat eye syndrome chromosome region, candidate 1	CECR1	0,0094	-2,41565
	carboxylesterase 1	CES1	0,0486	-2,39496
	Unc-5 homolog C (C. elegans)	UNC5C	0,0228	-2,34554
	ADP-ribosyltransferase 4 (Dombrock blood group)	ART4	0,0009	-2,29272
	microRNA 921	MIR921	0,0017	-2,2809
	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	HEY2	0,0126	-2,26396

Durant la suite de la thèse, je me suis plus particulièrement intéressé à l'aldéhyde déshydrogénase 1A1. Ce gène est le plus fortement dérégulé entre les conditions contrôles et pathologiques dans les résultats des puces que nous avons réalisées. Ainsi, cette cible serait potentiellement impliquée dans le maintien du phénotype quiescent des VIC, et la diminution d'expression de gène pourrait être un évènement clé dans la différenciation ostéoblastique des VIC.

La superfamille de l'ALDH est composée de 19 enzymes NADP dépendantes catalysant l'oxydation d'aldéhydes en acides carboxyliques. La famille ALDH1 est essentiellement présente dans le cytosol de cellules progénitrices dendritiques et hématopoïétiques et des cellules musculaires lisses, ainsi que dans divers tissus (par exemple le foie, les reins et le cerveau) (Yoshida 1992) (Gasparetto, Sekulovic et al. 2012). Cette famille joue également un rôle dans la détoxification des produits de peroxydation des aldéhydes dérivés du métabolisme des acides aminés, des vitamines, des stéroïdes ou des lipides (Wang, Han et al. 2009). La sous-famille ALDH1A comprend les ALDHs primaires (ALDH1A1, 1A2 et 1A3) responsables de la synthèse de l'acide rétinoïque (AR) à partir de rétinol, un produit d'oxydation du rétinol (vitamine A). Ces isoformes sont donc cruciales dans la régulation de la signalisation de l'acide rétinoïque. L'AR diffuse dans le noyau et se fixe sur des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) et les récepteurs X des rétinoïdes (RXR) (Lefebvre, Benomar et al. 2010, Pawlak, Lefebvre et al. 2012). Après hétérodimérisation, les complexes de récepteur activés se lient alors à des éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE), qui sont des séquences régulatrices de gènes cibles et vont alors moduler la transcription de gènes impliqués dans une grande variété de processus biologiques tels que la prolifération, l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Tang and Gudas 2011). Les rétinoïdes sont reconnus comme des facteurs déterminants dans le contrôle de la différenciation cellulaire (Nallamshetty, Wang et al. 2013). Il a été montré que l'activation de RAR par l'AR peut induire la différenciation des cellules souches en adipocytes (Monteiro, Wdziekonski et al. 2009), tandis que l'inhibition de RAR induit les processus de chondrogenèse dans des cellules souches mésenchymateuses (Kafienah, Mistry et al. 2007). L'activation du complexe RAR/RXR empêche également la différenciation des cellules épithéliales squameuses bronchiques (Lee, Dawson et al. 1996), mais favorise la différenciation des cellules myéloïdes (Dawson, Elstner et al. 1994). De

façon intéressante, certaines cellules souches possèdent une activité ALDH1A1 plus élevée que les cellules normales. Cette caractéristique est d'ailleurs exploitée pour l'isolement de populations de cellules souches primitives (Storms, Green et al. 2005). L'ensemble de ces arguments semblent en faveur d'un rôle pour l'ALDH1A1 dans la modulation de la voie de signalisation des rétinoïdes et de la plasticité des VIC. En effet, l'ALDH1A1 et son produit présentent des effets sur les processus inflammatoires, fibrotiques et de calcification dans d'autres types de cellules que les VIC. Par exemple, l'inhibition de l'ALDH1A1 induit un phénotype pro-ostéoblastique dans les cellules stromales (Nallamshetty, Wang et al. 2013), tandis que l'AR inhibe la minéralisation ostéoblastique (Lind, Sundqvist et al. 2013), réduit l'expression de l'ostéoprotégérine par l'activation de RAR (Jacobson, Johansson et al. 2004), supprime la production d'IL-6 (Ahmed, Sammons et al. 2000) et empêche la fibrose (Manolescu, Jankowski et al. 2014, Zhang, Zhang et al. 2014).

Les objectifs de ce chapitre de thèse est de déterminer le profil d'expression de l'ALDH1A1 dans les valves aortiques humaines contrôles et sténosées et d'étudier les effets de la modulation de cette enzyme et de son produit, l'acide rétinoïque, sur les VIC.

Résultats : implication de l'ALDH1A1 dans la SVA

Dans un premier, la différence d'expression de l'ALDH1A1 a été confirmée dans d'autres cultures de VIC que celles qui ont servi à réaliser l'analyse transcriptomique au niveau génique et protéique (figure 21). Puis, afin de vérifier que cette expression n'est pas un artefact du à la mise en culture des VIC, des immunomarquages de l'ALDH1A1 ont été réalisés sur des coupes histologiques de valves aortiques pathologiques et contrôles. Les résultats montrent que les valves contrôles présentent un marquage plus intense que les valves pathologiques (figure 21). Enfin, des qPCR réalisées sur des broyats de valves aortiques montrent une expression diminuée de l'ALDH1A1 dans les zones valvulaires calcifiées par rapport aux zones non calcifiées (figure 21).

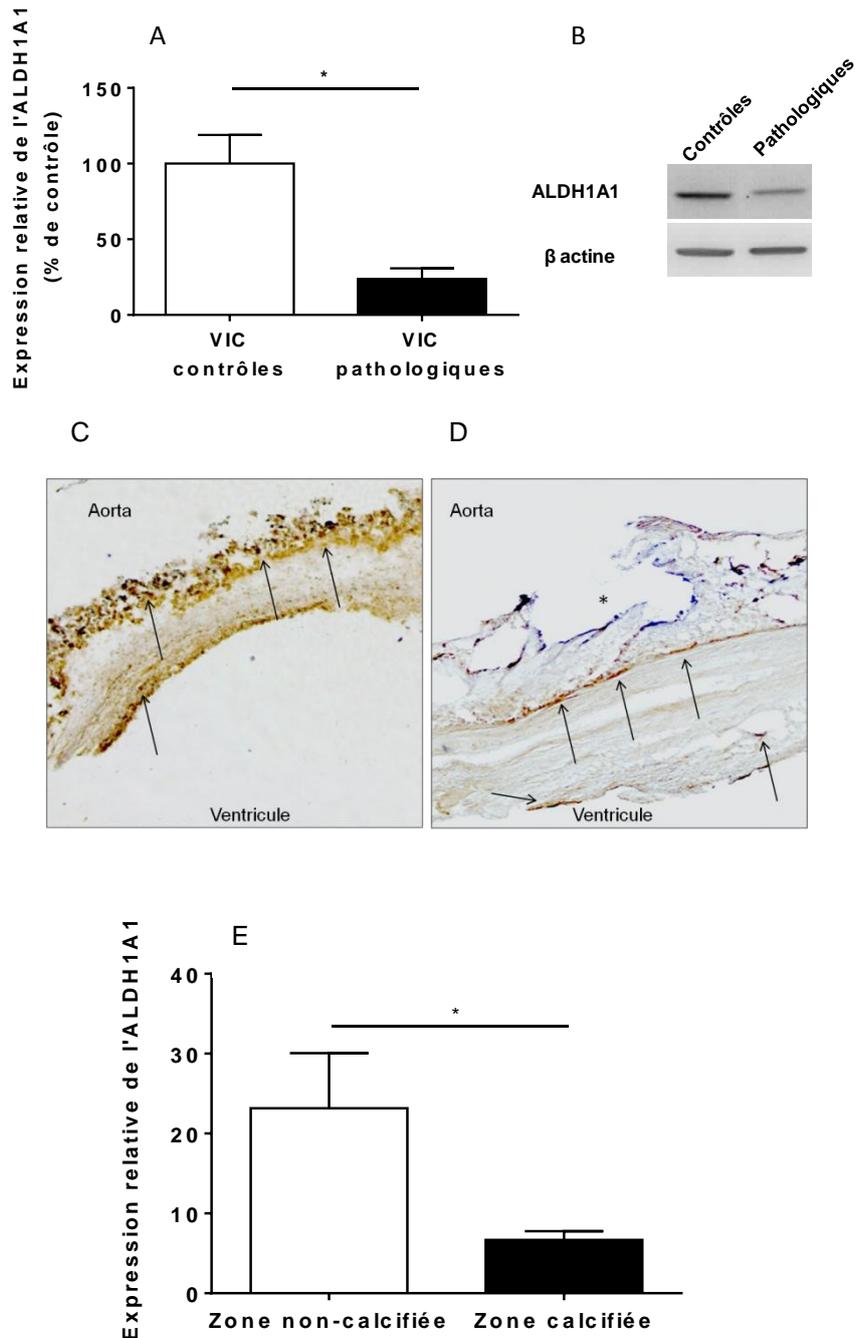


Figure 21: Profil d'expression de l'ALDH1A1 dans les VIC et les valves aortiques contrôles et pathologiques. (A-B) Expression génique et protéique de l'ALDH1A1 dans les VIC contrôles et pathologiques (n=5/groupe). (C-D) Immunomarquage de l'ALDH1A1 sur des coupes histologiques de valves aortiques contrôles et pathologiques. Images représentatives de 5 expériences. (E) Expression de l'ALDH1A1 dans les zones non-calcifiées et les zones calcifiées de 10 valves aortiques sténosées.

L'expression de l'ALDH1A1 au cours de la différenciation ostéoblastique des VIC a ensuite été étudiée. Après 14 jours en milieu procalcifiant, les VIC acquièrent un profil d'expression génique de type ostéoblastique avec notamment une expression accrue de RUNX2 (expression génique doublée par rapport à la condition contrôle définie par des VIC cultivées en milieu standard) et de la phosphatase alcaline (expression génique multipliée par 12 par rapport à la condition contrôle). En parallèle, il est à noter que l'expression génique de l'ALDH1A1 est divisée par 2 (figure 22A). Ce profil est retrouvé au niveau protéique (figure 22B).

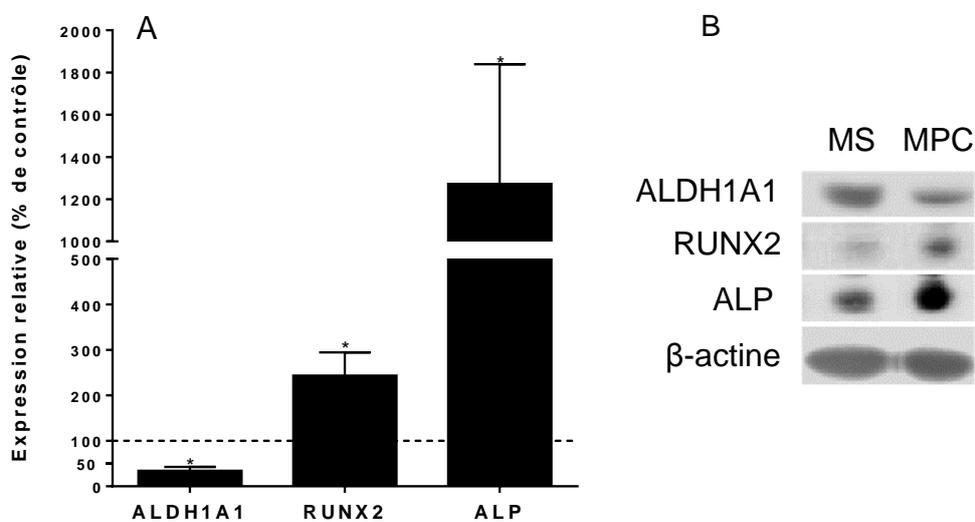


Figure 22 : Expression de l'ALDH1A1, RUNX2 et ALP dans des VIC pathologiques après 21 jours de culture en milieu procalcifiant. A) Expression génique déterminée par RT-PCR quantitative (résultats exprimés comme pourcentage du contrôle, défini par des VIC cultivées en milieu standard pendant 21 jours), B) Expressions protéiques déterminées par Western blot (n=4 expériences indépendantes). MS : milieu standard, MPC : milieu procalcifiant

Comme présenté sur le « réceptogramme » de la figure 23, les VIC expriment les récepteurs à l'AR. Il était donc intéressant de stimuler les VIC pathologiques avec de l'AR. En effet, les VIC pathologiques présentant moins d'ALDH1A1, il est envisageable qu'elles synthétisent moins d'AR. Ce phénomène pourrait jouer un rôle sur le profil ostéoblastique des VIC. Ainsi, une supplémentation du milieu en AR contrecarrerait le processus procalcifiant dans les VIC. Au niveau des calcifications macroscopiques, on peut voir un effet inhibiteur dose dépendant de l'AR. L'analyse de l'activité phosphatase alcaline permettra de conforter ce résultat au niveau fonctionnel. L'effet de l'AR a également été évalué au niveau génique sur les gènes

impliqués dans les processus de calcification (figure 23). L'expression de RAR β , isoforme dont l'expression est augmentée en présence d'AR a également été étudiée. Les résultats indiquent que 3 jours de traitement en milieu procalcifiant sont insuffisants pour induire une modulation des gènes ostéogénique. Néanmoins, dès 7 jours de stimulation, l'expression l'ALP et RUNX2 est diminuée de manière dose dépendante. Cet effet se prolonge ensuite jusqu'à 21 jours de stimulation pour l'ALP alors que l'expression de RUNX2 augmente sensiblement à 14 et 21 jours.

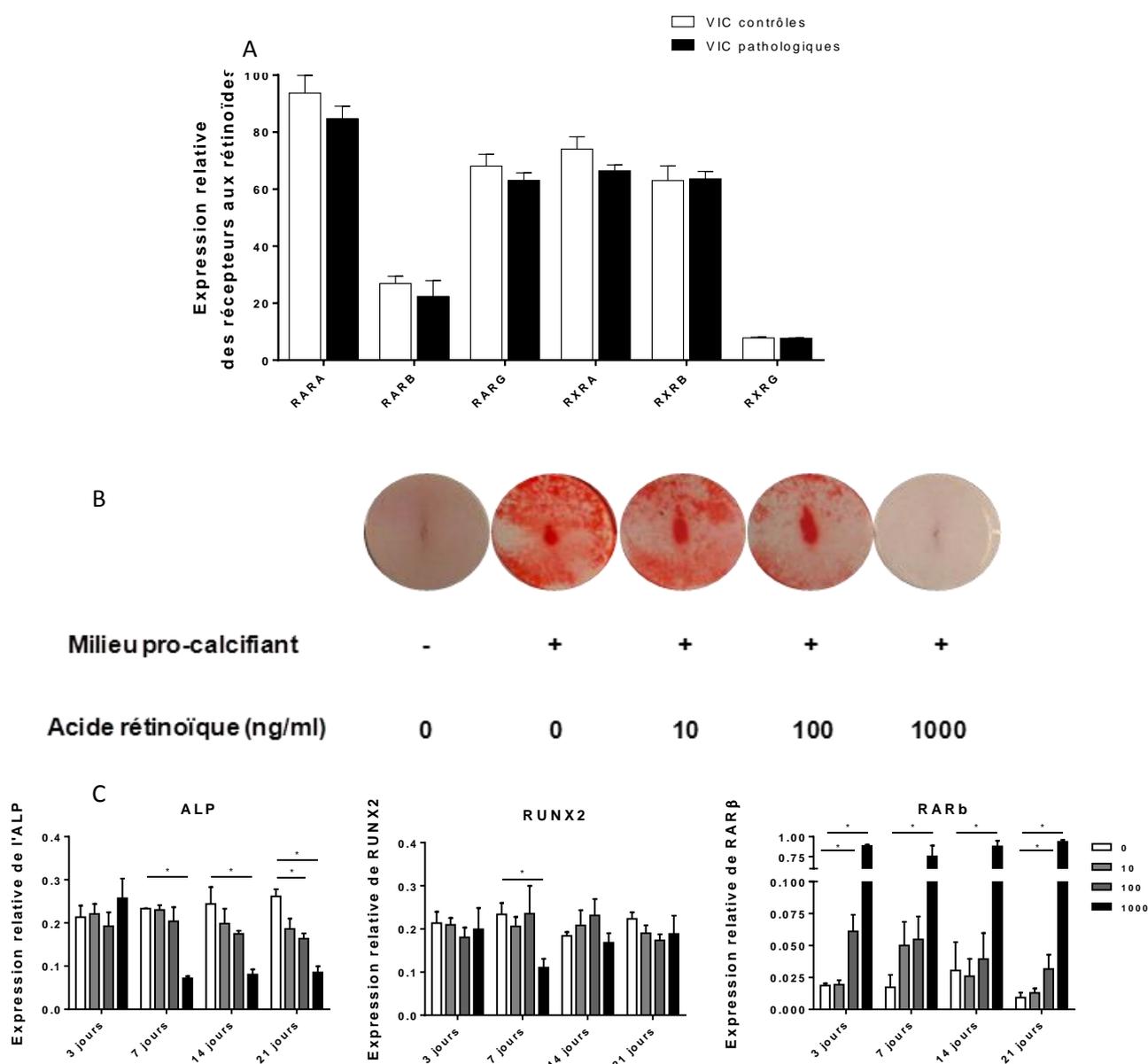


Figure 23 : Effets de l'acide rétinoïque sur les VIC pathologiques A) Réceptogramme : Graphique représentant l'expression des récepteurs nucléaires aux rétinoïdes RAR (α , β , γ) et RXR (α , β , γ) dans les VIC contrôles et pathologiques (n=5 par groupe), B) coloration au rouge alizarine après stimulation de VIC pathologiques par l'AR pendant 21 jours, C) expression de l'ALP, RUNX2 et RAR β après stimulation de VIC pathologiques par l'AR.

Analyse transcriptomique et rôles de l'ALDH1A1/Acide rétinoïque dans la SVA

Discussion

Durant cette thèse, j'ai donc réalisé les travaux de transcriptomique comparant des VIC issues de valves contrôles à des VIC issues de valves sténosées. Après une solide étude bibliographique sur l'ALDH1A1 et l'acide rétinolique, en étudiant le rôle potentiel de ce gène et cette voie dans la SVA, il a fallu confirmer au niveau protéique que l'ALDH1A1 est plus exprimé dans les VIC contrôles que les VIC pathologiques. Des expériences d'immunohistochimie ont permis de montrer que l'ALDH1A1 semble plus exprimée dans les valves contrôles que dans les valves fibrocalcifiées et que son gène est plus exprimé dans les zones tissulaires des valves pathologiques par rapport aux zones calcifiées. Ces résultats nécessitent néanmoins d'être confortés. En effet, il serait intéressant de confirmer que l'ALDH1A1 est différenciellement exprimée au niveau protéique entre les valves contrôles et les valves sténosées. Pour cela, des expériences de western blot pourraient confirmer les premiers résultats d'immunohistochimie. De plus, l'analyse de l'activité ALDH dans ces broyats protéiques pourrait appuyer encore l'importance de cette enzyme dans la physiopathologie de la SVA. En 2013, une équipe a montré que l'ALDH1A1 pouvait être impliquée dans les processus de calcification en modulant l'expression de l'ALP, BMP-2 et RUNX2 dans un modèle de souris transgéniques déficientes pour l'ALDH1A1 (Nallamshetty, Wang et al. 2013). L'ALDH1A1 est également impliquée dans la prise en charge des espèces réactives des aldéhydes. Ces espèces réactives des aldéhydes peuvent être impliquées dans les processus athéroscléreux tels que l'inflammation ou l'apoptose (Lee, Seo et al. 2008); (Willis, Klassen et al. 2004). L'étude de ces processus dans les VIC, notamment en évaluant la concentration de malondialdéhyde (MDA) produit par l'ALDH1A1 (Manzer, Qamar et al. 2003, Lind, Sundqvist et al. 2013) permettrait de mieux cerner l'ensemble des implications de cette enzyme dans la physiopathologie de la SVA.

Par la suite, l'étude des effets de l'acide rétinolique, produit de l'ALDH1A1, sur des VIC pathologiques montre un effet protecteur contre les calcifications, notamment en modulant l'expression de gènes impliqués dans ces processus. En accord avec nos résultats, une équipe a suggéré que l'acide rétinolique est un régulateur négatif de la différenciation des ostéoblastes (Lind, Sundqvist et al. 2013). De plus, il a été montré

que la stimulation de RAR γ induit une forte inhibition de calcifications dans un modèle murin de calcifications hétérotopiques (Shimono, Tung et al. 2011).

Il est maintenant clairement établi que les processus d'apoptose sont prépondérants dans l'initiation des calcifications cardiovasculaires. Dans ce contexte, il a été démontré que la stimulation de cardiomyocytes par de l'AR empêche les processus apoptotiques induits par l'angiotensine II et le stress mécanique (Chaudhary, De et al. 2015).

A l'inverse de nos résultats, certaines études semblent montrer que le RA induit les processus de calcification. La stimulation de chondrocytes par le RA a montré une augmentation d'expression et d'activité de la phosphatase alcaline, une augmentation de production du collagène de type I et une activité MMP augmentée (Wu, Ishikawa et al. 1997). En 2013 une équipe a montré qu'un apport alimentaire excessif en vitamine A entraîne une calcification massive de la valve aortique *in vivo*, entraînant une augmentation d'expression de RUNX2 et du collagène de type I dans les valves aortiques explantées de souris (Huk, Hammond et al. 2013). Néanmoins, plusieurs aspects de cette étude posent question. Certaines expériences étant réalisées sur des explants de valve mitrale d'embryon de poulet, il est compliqué de tirer des conclusions sur la valve aortique murine ou humaine. De la même façon, les stimulations des explants valvulaires par l'acide rétinoïque sont réalisées pendant 48h seulement avant de procéder à la coloration Von Kossa (Huk, Hammond et al. 2013).

D'un point de vue plus général, le RA a des effets pléiotropes sur les processus physiopathologiques impliqués dans l'athérosclérose et la SVA. Dans la média, le RA favorise la différenciation, la contractilité et la survie des CML. Dans l'intima, on observe une augmentation d'expression de la NO synthase, une diminution d'expression des molécules d'adhérence cellulaire et une inhibition de la migration des CML médiée par l'AR. Plusieurs études montrent également que l'AR pourrait limiter l'inflammation en réprimant la production de cytokines proinflammatoires (Rhee, Nallamshetty et al. 2012). Enfin, en 2016, une équipe a montré que des taux sériques élevés d'acide rétinoïque étaient associés à un faible risque de mortalité chez des patients atteints de pathologie coronaire (Liu, Chen et al. 2016). L'étude de

ces données dans les VIC permettrait de mieux comprendre l'implication de l'ALDH1A1 et le RA dans la physiopathologie de la SVA et décrire ainsi une nouvelle voie impliquée dans cette pathologie.

CONCLUSION GENERALE

Comme nous l'avons vu, les calcifications cardiovasculaires, issues de processus actifs se déroulant au sein du système artériel, jouent un rôle important dans l'athérosclérose vasculaire et la dégénérescence de la valve aortique. Ces calcifications, quand elles se développent au sein des plaques d'athérosclérose peuvent moduler la stabilité de la plaque. Les macrocalcifications seront plutôt stabilisatrices, alors que les microcalcifications déstabiliseront l'organisation de la chape fibreuse. Lorsqu'elles apparaissent au niveau de la valve aortique, ces calcifications diminuent la surface fonctionnelle de la valve aortique et perturbent l'éjection du sang du ventricule gauche vers la circulation générale. Ces processus de calcification sont activement modulés par les cellules résidant dans la paroi artérielle et la valve aortique. Cette thèse s'est focalisée sur le rôle des macrophages dans les calcifications vasculaires et le rôle des VIC dans les calcifications valvulaires. Ces 2 types cellulaires sont caractérisés par une importante plasticité fonctionnelle permettant leur adaptation à leur environnement. La compréhension des mécanismes régissant l'acquisition des différents phénotypes fonctionnels de ces cellules est nécessaire pour envisager leur modulation.

Dans la première partie de cette thèse, dédiée aux processus de calcification impliqués dans l'athérosclérose vasculaire, nous avons étudié le phénotype des macrophages bordant les zones de calcification dans des plaques d'athérosclérose humaines. Nous avons également analysé le phénotype ostéoclastique de monocytes polarisés en macrophages *in vitro* et les mécanismes impliqués dans l'acquisition de ce phénotype.

L'article que nous avons soumis à *Circulation Research* précise que les macrophages en bordure des calcifications de lésions d'athérosclérose expriment le CD68 et le MR, suggérant que ces macrophages sont des macrophages de type alternatif. Nous mettons également en évidence que des monocytes polarisés *in vitro* en macrophages alternatifs expriment des marqueurs ostéoclastiques. Néanmoins, ce profil d'expression est altéré, les M2 exprimant faiblement NFATc-1 et la CTSK par rapport aux RM, deux acteurs majeurs de la différenciation et la fonctionnalité des ostéoclastes. Les M2 polarisés *in vitro* expriment fortement RANK, récepteur prépondérant dans la différenciation ostéoclastique, en comparaison avec des RM. Cependant, le profil ostéoclastique induit par le couple RANKL/MCSF est déficient

Conclusion générale

dans les macrophages alternatifs. En effet, la stimulation par RANKL/MCSF induit une forte augmentation d'expression de la machinerie ostéoclastique dans les RM, alors que ce traitement ne produit pas d'effet sur le M2. Au niveau fonctionnel, des monocytes différenciés en M2 sur des lamelles d'os bovin, stimulés par le RANKL/MCSF ne présentent aucune maturation ostéoclastique par rapport aux RM (pas de cellules multinucléées, ni de marquage TRAP positif). De plus, ces M2 ne présentent pas d'activité de résorption osseuse en comparaison avec des RM. Ces différences peuvent s'expliquer au niveau moléculaire. L'expression de répresseurs de l'ostéoclastogénèse, Bcl-6 et IRF8 sont surexprimés dans les M2 par rapport aux RM. A l'inverse, Blimp1, activateur de la différenciation ostéoclastique, est sous-exprimé dans les M2 comparé aux RM. Ainsi, l'inhibition de l'expression de Blimp1 dans les RM par siRNA montre une diminution d'expression de NFATc-1, l'autre activateur de la différenciation, suggérant un phénotype comparable à celui des M2. Ce travail a permis de mieux comprendre le phénotype et le rôle des macrophages alternatifs dans la calcification vasculaire, notamment le rôle dans la stabilisation des calcifications vasculaires. Pour compléter cette étude, l'analyse du profil ostéoclastogénique de macrophages classiques M1 pourrait renforcer les liens existant entre la formation des calcifications et les processus inflammatoires (Tintut, Patel et al. 2002). Enfin, il serait intéressant par la suite d'étudier les connexions entre les CML et les macrophages et la modulation des différents phénotypes de ces cellules, chacun de ces deux types cellulaires étant impliqué dans une partie des mécanismes de calcification, la production de matrice calcifiée d'une part et la résorption de cette matrice d'autre part.

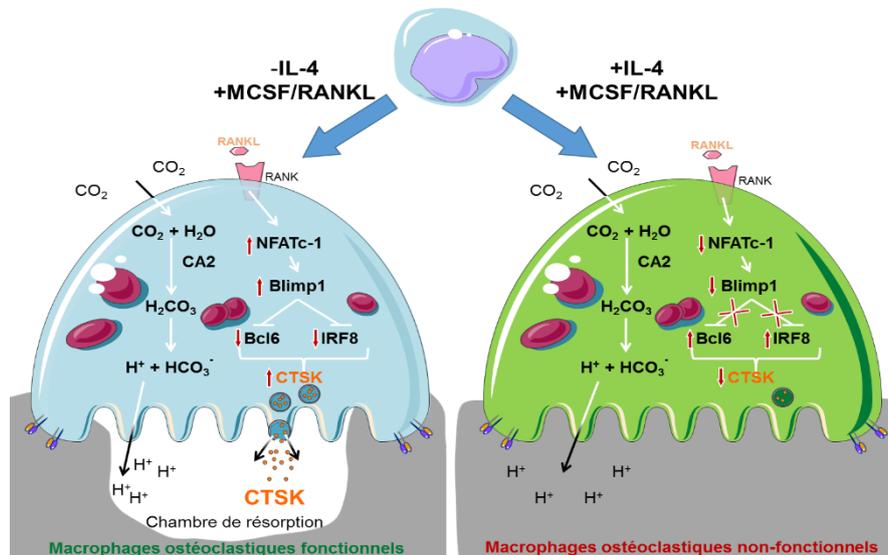


Figure 24 : Schéma explicatif de la différenciation incomplète des macrophages M2 en ostéoclastes

Dans un second temps, cette thèse s'est intéressée aux processus de calcification valvulaire. Les VIC étant les cellules prépondérantes dans ce mécanisme et dans la physiologie/physiopathologie de la SVA, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à ce type cellulaire.

Ainsi, le deuxième travail présenté dans cette thèse s'est intéressé aux processus de calcification médiés par la leptine dans les VIC. Cette étude réalisée a priori est basée sur les connaissances autour de la leptine, son implication dans les pathologies cardiovasculaires et ses effets sur la calcification, notamment des CML (Elkalioubie, Zawadzki et al. 2013), (Zeadin, Butcher et al. 2012)). Pour cette étude, deux groupes de patients ont été inclus : un groupe de patients adressés à l'hôpital pour une coronarographie et ne présentant pas de sténose aortique, et un groupe de patients présentant une sténose aortique, opérés pour un remplacement valvulaire mais sans pathologie athéroscléreuse associée. Notre étude montre que les patients présentant une SVA, après appariement sur l'âge et le sexe, présentent des taux sériques de leptine plus élevés que les patients du groupe non sténosé. Nous avons alors étudié l'expression de la leptine dans les valves aortiques explantées de ces patients, et nous avons mis en évidence que les concentrations de leptine sont plus élevées dans les zones calcifiées par rapport aux zones non calcifiées et que ces concentrations de leptine dans la valve sont directement et fortement corrélées avec

Conclusion générale

les taux sériques de leptine. Pour que la leptine puisse agir, il est nécessaire qu'elle se fixe sur son récepteur. Nous avons alors analysé l'expression de récepteurs dans ces valves aortiques. Nous montrons que les isoformes courte et longue sont exprimées au niveau génique et protéique dans la valve aortique. Les VIC expriment également ce récepteur. Ainsi, la stimulation des VIC par la leptine induit une augmentation de calcifications mises en évidence par la coloration au rouge alizarine de façon dose dépendante. Ce résultat est confirmé par le dosage de l'activité phosphatase alcaline. Au niveau génique, la stimulation par la leptine induit l'expression de gènes ostéogéniques (ALP, BMP-2, RUNX2) et inhibe l'expression d'ostéopontine, souvent décrite comme anticalcifiante dans les calcifications vasculaires. La liaison de la leptine à son récepteur induit de nombreuses voies de signalisation, parmi lesquelles les voies Akt et ERK dont il est connu qu'elles favorisent les processus de calcification. Le traitement des VIC par de la leptine en présence ou non d'inhibiteur des voies Akt et ERK a alors été réalisé. Les résultats montrent que l'inhibition d'Akt ou ERK empêche la formation de dépôts calciques. L'activité phosphatase alcaline est également inhibée quand les cellules sont traitées par les inhibiteurs. Enfin, au niveau génique, le traitement par les inhibiteurs induit un retour de l'expression des marqueurs au niveau de la condition contrôle. Ces résultats semblent indiquer qu'un excès de leptine sérique pourrait contribuer à la dégénérescence fibrocalcique de la valve. Même si l'obésité n'est pas un facteur de risque pour la SVA, l'excès de tissu adipeux viscéral, exprimant la leptine en grande quantité, est directement impliqué dans les processus physiopathologiques de la SVA ((Mathieu and Boulanger 2014). Il sera également intéressant d'étudier l'association entre le tissu adipeux épique et le degré de calcification de la valve aortique des patients sténosés. D'un point de vue mécanistique, nous avons montré que la leptine pouvait moduler les processus de calcification par l'activation des voies Akt et ERK. L'étude de la voie Jak/STAT, classiquement activée par la leptine, sera importante pour compléter le rôle de la leptine dans les calcifications cardiovasculaires, cette voie n'ayant pas encore étudiée dans ce contexte.

Après cette étude a priori, basée sur des données clinico-biologiques et des données de la littérature, il était nécessaire de procéder à une analyse transcriptomique sans a priori pour étudier l'ensemble des différences entre VIC isolées de valves contrôles et sténosées. Depuis plusieurs années, cette approche a été appliquée dans le cadre

Conclusion générale

de la SVA. En 2009, la première étude transcriptomique dans le cadre de la SVA a été menée sur des broyats de valves aortiques humaines contrôles et sténosées. A partir de ces données, cette équipe a ensuite mis en évidence l'implication de l'ectonucléotidase ENPP1 dans le développement de la SVA (Bouchareb, Boulanger et al. 2014), (Mahmut, Boulanger et al. 2015). En suivant la même approche sur des VIC isolées et mises en culture, nous avons mis en évidence une expression différentielle de l'ALDH1A1, une enzyme impliquée dans la prise en charge des aldéhydes réactifs et dans la synthèse de l'acide rétinoïque. Ces résultats de transcriptomique ont été validés sur 5 cultures issues de valves sténosées et 5 autres cultures issues de valves contrôles au niveau génique et protéique. Nous avons mis en évidence que l'ALDH1A1 est moins exprimée dans les valves pathologiques par rapport aux valves contrôles au niveau génique. Il est indispensable de confirmer ce résultat au niveau de l'activité enzymatique de l'ALDH1A1. Ce travail montre également que l'ALDH1A1 est sous exprimée au cours de la différenciation ostéoblastique des VIC. De plus, le produit de cette enzyme, l'acide rétinoïque, inhibe l'expression de gènes ostéogéniques (ALP et RUNX2) et prévient la formation de calcifications *in vitro* de manière dose dépendante. Ainsi, dans cette troisième partie, nous avons découvert une nouvelle voie potentiellement impliquée dans la différenciation ostéoblastique des VIC et le développement des calcifications valvulaires. La meilleure connaissance de l'ALDH1A1 et de l'acide rétinoïque, ainsi que leur rôle dans le développement de la SVA pourrait à terme permettre d'envisager le développement de composés pharmacologiques ciblés afin de limiter les approches chirurgicales invasives actuelles.

En conclusion, ces travaux apportent de nouveaux éléments dans la compréhension de l'initiation et de la progression des calcifications cardiovasculaires. Ils mettent l'accent sur l'incapacité des macrophages M2 à prendre en charge la dégradation des calcifications de la paroi artérielle dans les stades avancés d'athérosclérose. Ils expliquent le rôle de la leptine et par extension du tissu adipeux sur la progression des calcifications valvulaires et enfin proposent une nouvelle voie métabolique impliquée dans l'initiation du phénotype ostéoblastique des VIC. La plasticité des cellules impliquées dans ces calcifications, aussi bien des monocytes/macrophages que des VIC, représente un champ d'investigation complexe, mais important à appréhender pour mieux comprendre et prendre en charge ces pathologies. Mieux

Conclusion générale

comprendre la calcification liée aux changements de phénotypes de ces cellules et d'étudier les interactions entre ces différents types cellulaires pourraient être une étape importante dans l'ouverture de nouvelles voies dans la prévention du développement des calcifications cardiovasculaires.

Bibliographie

A

Abedin, M., Y. Tintut and L. L. Demer (2004). "Mesenchymal stem cells and the artery wall." Circ Res **95**(7): 671-676.

Abu-Amer, Y. (2001). "IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF-kappaB." J Clin Invest **107**(11): 1375-1385.

Ahmed, N., J. Sammons, M. A. Khokher and H. T. Hassan (2000). "retinoic acid suppresses interleukin 6 production in normal human osteoblasts." Cytokine **12**(3): 289-293.

Aikawa, E., M. Aikawa, P. Libby, J. L. Figueiredo, G. Rusanescu, Y. Iwamoto, D. Fukuda, R. H. Kohler, G. P. Shi, F. A. Jaffer and R. Weissleder (2009). "Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease." Circulation **119**(13): 1785-1794.

Aikawa, E., P. Whittaker, M. Farber, K. Mendelson, R. F. Padera, M. Aikawa and F. J. Schoen (2006). "Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering." Circulation **113**(10): 1344-1352.

Aikawa, M., E. Rabkin, S. Sugiyama, S. J. Voglic, Y. Fukumoto, Y. Furukawa, M. Shiomi, F. J. Schoen and P. Libby (2001). "An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and *in vitro*." Circulation **103**(2): 276-283.

Ait-Ali, L., I. Foffa, P. Festa and M. Graziaandrea (2012). "[Bicuspid aortic valve: epidemiology, genetics and clinics]." Recenti Prog Med **103**(12): 589-595.

Albarran-Juarez, J., H. Kaur, M. Grimm, S. Offermanns and N. Wettschureck (2016). "Lineage tracing of cells involved in atherosclerosis." Atherosclerosis **251**: 445-453.

Allahverdian, S., A. C. Chehroudi, B. M. McManus, T. Abraham and G. A. Francis (2014). "Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis." Circulation **129**(15): 1551-1559.

Aloisi, F. (2001). "Immune function of microglia." Glia **36**(2): 165-179.

Ambrose, J. A. and S. Srikanth (2010). "Vulnerable plaques and patients: improving prediction of future coronary events." Am J Med **123**(1): 10-16.

Arevalos, C. A., J. M. Berg, J. M. Nguyen, E. L. Godfrey, C. Iriando and K. J. Grande-Allen (2016). "Valve Interstitial Cells Act in a Pericyte Manner Promoting Angiogenesis and Invasion by Valve Endothelial Cells." Ann Biomed Eng **44**(9): 2707-2723.

Auwerx, J. and B. Staels (1998). "Leptin." Lancet **351**(9104): 737-742.

B

Balderman, J. A., H. Y. Lee, C. E. Mahoney, D. E. Handy, K. White, S. Annis, D. Lebeche, R. J. Hajjar, J. Loscalzo and J. A. Leopold (2012). "Bone morphogenetic protein-2 decreases

Bibliographie

microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification." J Am Heart Assoc **1**(6): e003905.

Ball, R. Y., E. C. Stowers, J. H. Burton, N. R. Cary, J. N. Skepper and M. J. Mitchinson (1995). "Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma." Atherosclerosis **114**(1): 45-54.

Baumgartner, H., J. Hung, J. Bermejo, J. B. Chambers, A. Evangelista, B. P. Griffin, B. Lung, C. M. Otto, P. A. Pellikka, M. Quinones, E. American Society of and E. European Association of (2009). "Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice." J Am Soc Echocardiogr **22**(1): 1-23; quiz 101-102.

Belland, R. J., S. P. Ouellette, J. Gieffers and G. I. Byrne (2004). "Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis." Cell Microbiol **6**(2): 117-127.

Ben-Zvi, D., N. Savion, F. Kolodgie, A. Simon, S. Fisch, K. Schafer, N. Bachner-Hinenzon, X. Cao, A. Gertler, G. Solomon, E. Kachel, E. Raanani, J. Lavee, S. Kotev Emeth, R. Virmani, F. J. Schoen and J. Schneiderman (2016). "Local Application of Leptin Antagonist Attenuates Angiotensin II-Induced Ascending Aortic Aneurysm and Cardiac Remodeling." J Am Heart Assoc **5**(5).

Bennett, M. R., S. Sinha and G. K. Owens (2016). "Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis." Circ Res **118**(4): 692-702.

Berendsen, A. D. and B. R. Olsen (2015). "Bone development." Bone **80**: 14-18.

Berliner, J. A., M. Navab, A. M. Fogelman, J. S. Frank, L. L. Demer, P. A. Edwards, A. D. Watson and A. J. Lusis (1995). "Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics." Circulation **91**(9): 2488-2496.

Bertazzo, S., E. Gentleman, K. L. Cloyd, A. H. Chester, M. H. Yacoub and M. M. Stevens (2013). "Nano-analytical electron microscopy reveals fundamental insights into human cardiovascular tissue calcification." Nat Mater **12**(6): 576-583.

Bild, D. E., R. Detrano, D. Peterson, A. Guerci, K. Liu, E. Shahar, P. Ouyang, S. Jackson and M. F. Saad (2005). "Ethnic differences in coronary calcification: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)." Circulation **111**(10): 1313-1320.

Bjorkerud, B. and S. Bjorkerud (1996). "Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(3): 416-424.

Bobryshev, Y. V., A. N. Orekhov, I. Sobenin and D. A. Chistiakov (2014). "Role of bone-type tissue-nonspecific alkaline phosphatase and PHOSPO1 in vascular calcification." Current Pharmaceutical Design **20**(37): 5821-5828.

Bories, G., S. Colin, J. Vanhoutte, B. Derudas, C. Copin, M. Fanchon, M. Daoudi, L. Belloy, S. Haulon, C. Zawadzki, B. Jude, B. Staels and G. Chinetti-Gbaguidi (2013). "Liver X receptor activation stimulates iron export in human alternative macrophages." Circ Res **113**(11): 1196-1205.

Bosse, Y., P. Mathieu and P. Pibarot (2008). "Genomics: the next step to elucidate the etiology of calcific aortic valve stenosis." J Am Coll Cardiol **51**(14): 1327-1336.

Bosse, Y., A. Miqdad, D. Fournier, A. Pepin, P. Pibarot and P. Mathieu (2009). "Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression

Bibliographie

profile of normal and calcified stenotic human aortic valves." Circ Cardiovasc Genet **2**(5): 489-498.

Bossé, Y., A. Miqdad, D. Fournier, A. Pépin, P. Pibarot and P. Mathieu (2009). "Refining Molecular Pathways Leading to Calcific Aortic Valve Stenosis by Studying Gene Expression Profile of Normal and Calcified Stenotic Human Aortic Valves." Circulation: Cardiovascular Genetics **2**(5): 489-498.

Bostrom, K., K. E. Watson, S. Horn, C. Wortham, I. M. Herman and L. L. Demer (1993). "Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions." J Clin Invest **91**(4): 1800-1809.

Bostrom, K. I., M. Jumabay, A. Matveyenko, S. B. Nicholas and Y. Yao (2011). "Activation of vascular bone morphogenetic protein signaling in diabetes mellitus." Circ Res **108**(4): 446-457.

Bostrom, K. I., N. M. Rajamannan and D. A. Towler (2011). "The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens." Circ Res **109**(5): 564-577.

Bouchareb, R., M. C. Boulanger, D. Fournier, P. Pibarot, Y. Messaddeq and P. Mathieu (2014). "Mechanical strain induces the production of spheroid mineralized microparticles in the aortic valve through a RhoA/ROCK-dependent mechanism." J Mol Cell Cardiol **67**: 49-59.

Boyle, J. J. (2012). "Heme and haemoglobin direct macrophage Mhem phenotype and counter foam cell formation in areas of intraplaque haemorrhage." Curr Opin Lipidol **23**(5): 453-461.

Butcher, J. T., G. J. Mahler and L. A. Hockaday (2011). "Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions." Adv Drug Deliv Rev **63**(4-5): 242-268.

Butcher, J. T., A. M. Penrod, A. J. Garcia and R. M. Nerem (2004). "Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1429-1434.

Butcher, M. J. and E. V. Galkina (2012). "Phenotypic and functional heterogeneity of macrophages and dendritic cell subsets in the healthy and atherosclerosis-prone aorta." Front Physiol **3**: 44.

Byon, C. H., A. Javed, Q. Dai, J. C. Kappes, T. L. Clemens, V. M. Darley-Usmar, J. M. McDonald and Y. Chen (2008). "Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling." J Biol Chem **283**(22): 15319-15327.

C

Capoulade, R., A. Mahmut, L. Tastet, M. Arsenault, E. Bedard, J. G. Dumesnil, J. P. Despres, E. Larose, B. J. Arsenault, Y. Bosse, P. Mathieu and P. Pibarot (2015). "Impact of plasma Lp-PLA2 activity on the progression of aortic stenosis: the PROGRESSA study." JACC Cardiovasc Imaging **8**(1): 26-33.

Cardus, A., S. Panizo, E. Parisi, E. Fernandez and J. M. Valdivielso (2007). "Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification." J Bone Miner Res **22**(6): 860-866.

Bibliographie

Chaudhary, S. K., A. De, S. Bhadra and P. K. Mukherjee (2015). "Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory potential of standardized *Mucuna pruriens* seed extract." Pharm Biol **53**(11): 1614-1620.

Chavez, R. J., R. M. Haney, R. H. Cuadra, R. Ganguly, R. K. Adapala, C. K. Thodeti and P. Raman (2012). "Upregulation of thrombospondin-1 expression by leptin in vascular smooth muscle cells *via* JAK2- and MAPK-dependent pathways." American Journal of Physiology. Cell Physiology **303**(2): C179-191.

Chen, J. H. and C. A. Simmons (2011). "Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues." Circ Res **108**(12): 1510-1524.

Chen, J. H., C. Y. Yip, E. D. Sone and C. A. Simmons (2009). "Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential." Am J Pathol **174**(3): 1109-1119.

Chen, N. X., K. D. O'Neill, X. Chen and S. M. Moe (2008). "Annexin-mediated matrix vesicle calcification in vascular smooth muscle cells." J Bone Miner Res **23**(11): 1798-1805.

Cheng, J., J. Liu, Z. Shi, D. Xu, S. Luo, G. P. Siegal, X. Feng and S. Wei (2011). "Interleukin-4 inhibits RANKL-induced NFATc1 expression *via* STAT6: a novel mechanism mediating its blockade of osteoclastogenesis." J Cell Biochem **112**(11): 3385-3392.

Chinetti-Gbaguidi, G., M. Baron, M. A. Bouhlef, J. Vanhoutte, C. Copin, Y. Sebti, B. Derudas, T. Mayi, G. Bories, A. Tailleux, S. Haulon, C. Zawadzki, B. Jude and B. Staels (2011). "Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRalpha pathways." Circ Res **108**(8): 985-995.

Chinetti-Gbaguidi, G., M. A. Bouhlef, C. Copin, C. Duhem, B. Derudas, B. Neve, B. Noel, J. Eeckhoutte, P. Lefebvre, J. R. Seckl and B. Staels (2012). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation induces 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in human alternative macrophages." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(3): 677-685.

Chinetti-Gbaguidi, G., S. Colin and B. Staels (2015). "Macrophage subsets in atherosclerosis." Nat Rev Cardiol **12**(1): 10-17.

Chinetti-Gbaguidi, G., C. Copin, B. Derudas, J. Vanhoutte, C. Zawadzki, B. Jude, S. Haulon, F. Pattou, N. Marx and B. Staels (2015). "The coronary artery disease-associated gene C6ORF105 is expressed in human macrophages under the transcriptional control of PPARgamma." FEBS Lett **589**(4): 461-466.

Chiu, Y. W., S. G. Adler, M. J. Budoff, J. Takasu, J. Ashai and R. Mehrotra (2010). "Coronary artery calcification and mortality in diabetic patients with proteinuria." Kidney Int **77**(12): 1107-1114.

Cho, H.-J., H.-J. Cho and H.-S. Kim (2009). "Osteopontin: A multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification." Current Atherosclerosis Reports **11**(3): 206-213.

Cho, K. Y., H. Miyoshi, S. Kuroda, H. Yasuda, K. Kamiyama, J. Nakagawara, M. Takigami, T. Kondo and T. Atsumi (2013). "The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery." J Stroke Cerebrovasc Dis **22**(7): 910-918.

Bibliographie

Choi, Y. H., Y.-J. Kim, H. M. Jeong, Y.-H. Jin, C.-Y. Yeo and K. Y. Lee (2014). "Akt enhances Runx2 protein stability by regulating Smurf2 function during osteoblast differentiation." FEBS Journal **281**(16): 3656-3666.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.

Cirka, H. A., M. H. Kural and K. L. Billiar (2015). "Mechanoregulation of aortic valvular interstitial cell life and death." J Long Term Eff Med Implants **25**(1-2): 3-16.

Clarke, M. C., T. D. Littlewood, N. Figg, J. J. Maguire, A. P. Davenport, M. Goddard and M. R. Bennett (2008). "Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration." Circ Res **102**(12): 1529-1538.

Coffey, S., B. Cox and M. J. Williams (2014). "The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis." J Am Coll Cardiol **63**(25 Pt A): 2852-2861.

Colin, S., G. Chinetti-Gbaguidi and B. Staels (2014). "Macrophage phenotypes in atherosclerosis." Immunol Rev **262**(1): 153-166.

Côté, N., D. El Hussein, A. Pépin, S. Guauque-Olarte, V. Ducharme, P. Bouchard-Cannon, A. Audet, D. Fournier, N. Gaudreault, H. Derbali, M. D. McKee, C. Simard, J.-P. Després, P. Pibarot, Y. Bossé and P. Mathieu (2012). "ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve." Journal of Molecular and Cellular Cardiology **52**(5): 1191-1202.

Cote, N., D. El Hussein, A. Pepin, S. Guauque-Olarte, V. Ducharme, P. Bouchard-Cannon, A. Audet, D. Fournier, N. Gaudreault, H. Derbali, M. D. McKee, C. Simard, J. P. Despres, P. Pibarot, Y. Bosse and P. Mathieu (2012). "ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve." J Mol Cell Cardiol **52**(5): 1191-1202.

Cote, N., A. Mahmut, Y. Bosse, C. Couture, S. Page, S. Trahan, M. C. Boulanger, D. Fournier, P. Pibarot and P. Mathieu (2013). "Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease." Inflammation **36**(3): 573-581.

Cripe, L., G. Andelfinger, L. J. Martin, K. Shoener and D. W. Benson (2004). "Bicuspid aortic valve is heritable." J Am Coll Cardiol **44**(1): 138-143.

Criqui, M. H., J. O. Denenberg, R. L. McClelland, M. A. Allison, J. H. Ix, A. Guerci, K. P. Cohoon, P. Srikanthan, K. E. Watson and N. D. Wong (2014). "Abdominal aortic calcium, coronary artery calcium, and cardiovascular morbidity and mortality in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(7): 1574-1579.

D

Danielsen, R., T. Aspelund, T. B. Harris and V. Gudnason (2014). "The prevalence of aortic stenosis in the elderly in Iceland and predictions for the coming decades: the AGES-Reykjavik study." Int J Cardiol **176**(3): 916-922.

Das, D., A. Holmes, G. A. Murphy, K. Mishra, A. C. Rosenkranz, J. D. Horowitz and J. A. Kennedy (2013). "TGF-beta1-Induced MAPK activation promotes collagen synthesis, nodule

Bibliographie

formation, redox stress and cellular senescence in porcine aortic valve interstitial cells." J Heart Valve Dis **22**(5): 621-630.

Davenport, C., E. Harper, H. Forde, K. D. Rochfort, R. P. Murphy, D. Smith and P. M. Cummins (2016). "RANKL promotes osteoblastic activity in vascular smooth muscle cells by upregulating endothelial BMP-2 release." Int J Biochem Cell Biol **77**(Pt A): 171-180.

Dawson, M. I., E. Elstner, M. Kizaki, D. L. Chen, S. Pakkala, B. Kerner and H. P. Koeffler (1994). "Myeloid differentiation mediated through retinoic acid receptor/retinoic X receptor (RXR) not RXR/RXR pathway." Blood **84**(2): 446-452.

de Gaetano, M., D. Crean, M. Barry and O. Belton (2016). "M1- and M2-Type Macrophage Responses Are Predictive of Adverse Outcomes in Human Atherosclerosis." Front Immunol **7**: 275.

Demer, L. L. and Y. Tintut (2014). "Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(4): 715-723.

Derbali, H., Y. Bossé, N. Côté, P. Pibarot, A. Audet, A. Pépin, B. Arsenault, C. Couture, J.-P. Després and P. Mathieu (2010). "Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein *via* Toll-like receptor 2." The American journal of pathology **176**(6): 2638-2645.

Desmouliere, A., M. Redard, I. Darby and G. Gabbiani (1995). "Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar." Am J Pathol **146**(1): 56-66.

Dlamini, N., M. Splitt, A. Durkan, A. Siddiqui, S. Padayachee, S. Hobbins, F. Rutsch and E. Wraige (2009). "Generalized arterial calcification of infancy: phenotypic spectrum among three siblings including one case without obvious arterial calcifications." Am J Med Genet A **149A**(3): 456-460.

Doherty, T. M., K. Asotra, L. A. Fitzpatrick, J. H. Qiao, D. J. Wilkin, R. C. Detrano, C. R. Dunstan, P. K. Shah and T. B. Rajavashisth (2003). "Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11201-11206.

Doherty, T. M., H. Uzui, L. A. Fitzpatrick, P. V. Tripathi, C. R. Dunstan, K. Asotra and T. B. Rajavashisth (2002). "Rationale for the role of osteoclast-like cells in arterial calcification." FASEB J **16**(6): 577-582.

Duewell, P., H. Kono, K. J. Rayner, C. M. Sirois, G. Vladimer, F. G. Bauernfeind, G. S. Abela, L. Franchi, G. Nunez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K. A. Fitzgerald, K. L. Rock, K. J. Moore, S. D. Wright, V. Hornung and E. Latz (2010). "NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals." Nature **464**(7293): 1357-1361.

E

Edep, M. E., J. Shirani, P. Wolf and D. L. Brown (2000). "Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis." Cardiovasc Pathol **9**(5): 281-286.

Ehara, S., Y. Kobayashi, M. Yoshiyama, K. Shimada, Y. Shimada, D. Fukuda, Y. Nakamura, H. Yamashita, H. Yamagishi, K. Takeuchi, T. Naruko, K. Haze, A. E. Becker, J. Yoshikawa

Bibliographie

and M. Ueda (2004). "Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study." Circulation **110**(22): 3424-3429.

El Husseini, D., M.-C. Boulanger, A. Mahmut, R. Bouchareb, M.-H. Laflamme, D. Fournier, P. Pibarot, Y. Bossé and P. Mathieu (2014). "P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: Implication for calcific aortic valve disease." Journal of Molecular and Cellular Cardiology **72**: 146-156.

El Husseini, D., M. C. Boulanger, A. Mahmut, R. Bouchareb, M. H. Laflamme, D. Fournier, P. Pibarot, Y. Bosse and P. Mathieu (2014). "P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: implication for calcific aortic valve disease." J Mol Cell Cardiol **72**: 146-156.

Elkalioubie, A., C. Zawadzki, C. Roma-Lavisse, G. Chinetti-Gbaguidi, M. Tagzirt, D. Corseaux, F. Juthier, B. Vaast, J. Vanhoutte, A. Vincentelli, B. Jude, S. Haulon, B. Staels, S. Susen, E. Van Belle and A. Dupont (2013). "Free leptin, carotid plaque phenotype and relevance to related symptomatology: insights from the OPAL-Lille carotid endarterectomy study." International Journal of Cardiology **168**(5): 4879-4881.

Elkalioubie, A., C. Zawadzki, C. Roma-Lavisse, G. Chinetti-Gbaguidi, M. Tagzirt, D. Corseaux, F. Juthier, B. Vaast, J. Vanhoutte, A. Vincentelli, B. Jude, S. Haulon, B. Staels, S. Susen, E. Van Belle and A. Dupont (2013). "Free leptin, carotid plaque phenotype and relevance to related symptomatology: insights from the OPAL-Lille carotid endarterectomy study." Int J Cardiol **168**(5): 4879-4881.

Erbel, C., A. Wolf, F. Lasitschka, F. Linden, G. Domschke, M. Akhavanpoor, A. O. Doesch, H. A. Katus and C. A. Gleissner (2015). "Prevalence of M4 macrophages within human coronary atherosclerotic plaques is associated with features of plaque instability." Int J Cardiol **186**: 219-225.

F

Falke, P., T. Matzsch, N. H. Sternby, D. Bergqvist and L. Stavenow (1995). "Intraplaque haemorrhage at carotid artery surgery--a predictor of cardiovascular mortality." J Intern Med **238**(2): 131-135.

Feig, J. E. and J. L. Feig (2012). "Macrophages, dendritic cells, and regression of atherosclerosis." Front Physiol **3**: 286.

Finn, A. V., M. Nakano, R. Polavarapu, V. Karmali, O. Saeed, X. Zhao, S. Yazdani, F. Otsuka, T. Davis, A. Habib, J. Narula, F. D. Kolodgie and R. Virmani (2012). "Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques." J Am Coll Cardiol **59**(2): 166-177.

Freeman, R. V. and C. M. Otto (2005). "Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies." Circulation **111**(24): 3316-3326.

Fudal, M., D. Domal-Kwiatkowska, A. Kuczaj, B. Ryfinski, E. Sliupkas-Dyrda, P. Wilczewski, S. Smolik, L. Weglarz, U. Mazurek and E. Nowalany-Kozielska (2010). "[Relation between local CMV infection and inflammatory cytokine expressionon in pts sheduled for CABG]." Wiad Lek **63**(4): 276-288.

Bibliographie

G

Garg, V., A. N. Muth, J. F. Ransom, M. K. Schluterman, R. Barnes, I. N. King, P. D. Grossfeld and D. Srivastava (2005). "Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease." Nature **437**(7056): 270-274.

Gasparetto, M., S. Sekulovic, C. Brocker, P. Tang, A. Zakaryan, P. Xiang, F. Kuchenbauer, M. Wen, K. Kasaian, M. F. Witty, P. Rosten, Y. Chen, S. Imren, G. Dueter, D. C. Thompson, R. K. Humphries, V. Vasiliou and C. Smith (2012). "Aldehyde dehydrogenases are regulators of hematopoietic stem cell numbers and B-cell development." Exp Hematol **40**(4): 318-329 e312.

Gautier, E. L. and L. Yvan-Charvet (2014). "Understanding macrophage diversity at the ontogenic and transcriptomic levels." Immunol Rev **262**(1): 85-95.

Genereux, P., S. J. Head, R. Hahn, B. Daneault, S. Kodali, M. R. Williams, N. M. van Mieghem, M. C. Alu, P. W. Serruys, A. P. Kappetein and M. B. Leon (2013). "Paravalvular leak after transcatheter aortic valve replacement: the new Achilles' heel? A comprehensive review of the literature." J Am Coll Cardiol **61**(11): 1125-1136.

Geng, Y. J. and P. Libby (1995). "Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme." Am J Pathol **147**(2): 251-266.

Giachelli, C. M. (2004). "Vascular calcification mechanisms." J Am Soc Nephrol **15**(12): 2959-2964.

Gilard, M., H. Eltchaninoff, B. Iung, P. Donzeau-Gouge, K. Chevreul, J. Fajadet, P. Leprince, A. Leguerrier, M. Lievre, A. Prat, E. Teiger, T. Lefevre, D. Himbert, D. Tchetché, D. Carrie, B. Albat, A. Cribier, G. Rioufol, A. Sudre, D. Blanchard, F. Collet, P. Dos Santos, N. Meneveau, A. Tirouvanziam, C. Caussin, P. Guyon, J. Bosch, H. Le Breton, F. Collart, R. Houel, S. Delpine, G. Souteyrand, X. Favereau, P. Ohlmann, V. Doisy, G. Grollier, A. Gommeaux, J. P. Claudel, F. Bourlon, B. Bertrand, E. Van Belle, M. Laskar and F. Investigators (2012). "Registry of transcatheter aortic-valve implantation in high-risk patients." N Engl J Med **366**(18): 1705-1715.

Ginsberg, H. N. and C. Tuck (2001). "Diabetes and dyslipidemia." Curr Diab Rep **1**(2): 93-95.

Glader, C. A., L. S. Birgander, S. Soderberg, H. P. Ildgruben, P. Saikku, A. Waldenstrom and G. H. Dahlen (2003). "Lipoprotein(a), Chlamydia pneumoniae, leptin and tissue plasminogen activator as risk markers for valvular aortic stenosis." Eur Heart J **24**(2): 198-208.

Glader, C. A., L. S. Birgander, S. Söderberg, H. P. Ildgruben, P. Saikku, A. Waldenström and G. H. Dahlén (2003). "Lipoprotein(a), Chlamydia pneumoniae, leptin and tissue plasminogen activator as risk markers for valvular aortic stenosis." European Heart Journal **24**(2): 198-208.

Gleissner, C. A. (2012). "Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis." Front Physiol **3**: 1.

Gleissner, C. A., I. Shaked, C. Erbel, D. Bockler, H. A. Katus and K. Ley (2010). "CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages." Circ Res **106**(1): 203-211.

Bibliographie

Gomez-Stallons, M. V., E. E. Wirrig-Schwendeman, K. R. Hassel, S. J. Conway and K. E. Yutzey (2016). "Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Required for Aortic Valve Calcification." Arterioscler Thromb Vasc Biol **36**(7): 1398-1405.

Gratchev, A., K. Schledzewski, P. Guillot and S. Goerdts (2001). "Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol **14**(5): 272-279.

Guaque-Olarte, S., D. Messika-Zeitoun, A. Droit, M. Lamontagne, J. Tremblay-Marchand, E. Lavoie-Charland, N. Gaudreault, B. J. Arseneault, M. P. Dube, J. C. Tardif, S. C. Body, J. G. Seidman, C. Boileau, P. Mathieu, P. Pibarot and Y. Bosse (2015). "Calcium Signaling Pathway Genes RUNX2 and CACNA1C Are Associated With Calcific Aortic Valve Disease." Circ Cardiovasc Genet **8**(6): 812-822.

H

Hajdu, Z., S. J. Romeo, P. A. Fleming, R. R. Markwald, R. P. Visconti and C. J. Drake (2011). "Recruitment of bone marrow-derived valve interstitial cells is a normal homeostatic process." J Mol Cell Cardiol **51**(6): 955-965.

Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." N Engl J Med **352**(16): 1685-1695.

Harken, D. E., H. S. Soroff, W. J. Taylor, A. A. Lefemine, S. K. Gupta and S. Lunzer (1960). "Partial and complete prostheses in aortic insufficiency." J Thorac Cardiovasc Surg **40**: 744-762.

Hasan-Ali, H., N. A. Abd El-Mottaleb, H. B. Hamed and A. Abd-Elseyed (2011). "Serum adiponectin and leptin as predictors of the presence and degree of coronary atherosclerosis." Coron Artery Dis **22**(4): 264-269.

Haubrich, W. S. (2004). "Kupffer of Kupffer cells." Gastroenterology **127**(1): 16.

Helske, S., S. Syvaranta, K. A. Lindstedt, J. Lappalainen, K. Oorni, M. I. Mayranpaa, J. Lommi, H. Turto, K. Werkkala, M. Kupari and P. T. Kovanen (2006). "Increased expression of elastolytic cathepsins S, K, and V and their inhibitor cystatin C in stenotic aortic valves." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(8): 1791-1798.

Hjortnaes, J., J. Butcher, J. L. Figueiredo, M. Riccio, R. H. Kohler, K. M. Kozloff, R. Weissleder and E. Aikawa (2010). "Arterial and aortic valve calcification inversely correlates with osteoporotic bone remodelling: a role for inflammation." Eur Heart J **31**(16): 1975-1984.

Hofbauer, L. C., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, T. C. Spelsberg, B. L. Riggs and S. Khosla (1999). "Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells." Bone **25**(3): 255-259.

Hofmann Bowman, M. A. and E. M. McNally (2012). "Genetic pathways of vascular calcification." Trends Cardiovasc Med **22**(4): 93-98.

Holliday, C. J., R. F. Ankeny, H. Jo and R. M. Nerem (2011). "Discovery of shear- and side-specific mRNAs and miRNAs in human aortic valvular endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **301**(3): H856-867.

Bibliographie

Hong, Y. J., M. H. Jeong, Y. H. Choi, J. S. Ko, M. G. Lee, W. Y. Kang, S. E. Lee, S. H. Kim, K. H. Park, D. S. Sim, N. S. Yoon, H. J. Yoon, K. H. Kim, H. W. Park, J. H. Kim, Y. Ahn, J. G. Cho, J. C. Park and J. C. Kang (2009). "Plaque characteristics in culprit lesions and inflammatory status in diabetic acute coronary syndrome patients." JACC Cardiovasc Imaging **2**(3): 339-349.

Hsieh, H. J., C. A. Liu, B. Huang, A. H. Tseng and D. L. Wang (2014). "Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications." J Biomed Sci **21**: 3.

Huk, D. J., H. L. Hammond, H. Kegechika and J. Lincoln (2013). "Increased dietary intake of vitamin A promotes aortic valve calcification in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(2): 285-293.

Hutcheson, J. D., C. Goettsch, S. Bertazzo, N. Maldonado, J. L. Ruiz, W. Goh, K. Yabusaki, T. Faits, C. Bouten, G. Franck, T. Quillard, P. Libby, M. Aikawa, S. Weinbaum and E. Aikawa (2016). "Genesis and growth of extracellular-vesicle-derived microcalcification in atherosclerotic plaques." Nat Mater **15**(3): 335-343.

I

Ikeda, K., Y. Souma, Y. Akakabe, Y. Kitamura, K. Matsuo, Y. Shimoda, T. Ueyama, S. Matoba, H. Yamada, M. Okigaki and H. Matsubara (2012). "Macrophages play a unique role in the plaque calcification by enhancing the osteogenic signals exerted by vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **425**(1): 39-44.

Inaba, M., S. Okuno, Y. Imanishi, S. Yamada, A. Shioi, T. Yamakawa, E. Ishimura and Y. Nishizawa (2006). "Role of fibroblast growth factor-23 in peripheral vascular calcification in non-diabetic and diabetic hemodialysis patients." Osteoporos Int **17**(10): 1506-1513.

Isner, J. M., M. Kearney, S. Bortman and J. Passeri (1995). "Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis." Circulation **91**(11): 2703-2711.

Isoda, K., T. Matsuki, H. Kondo, Y. Iwakura and F. Ohsuzu (2010). "Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(4): 708-715.

lung, B. and A. Vahanian (2012). "Degenerative calcific aortic stenosis: a natural history." Heart **98 Suppl 4**: iv7-13.

lung, B. and A. Vahanian (2014). "Epidemiology of acquired valvular heart disease." Can J Cardiol **30**(9): 962-970.

J

Jacobson, A., S. Johansson, M. Branting and H. Melhus (2004). "Vitamin A differentially regulates RANKL and OPG expression in human osteoblasts." Biochemical and Biophysical Research Communications **322**(1): 162-167.

Jaffer, F. A., D. E. Kim, L. Quinti, C. H. Tung, E. Aikawa, A. N. Pande, R. H. Kohler, G. P. Shi, P. Libby and R. Weissleder (2007). "Optical visualization of cathepsin K activity in

Bibliographie

atherosclerosis with a novel, protease-activatable fluorescence sensor." Circulation **115**(17): 2292-2298.

Jeziorska, M., C. McCollum and D. E. Wooley (1998). "Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries." Virchows Arch **433**(6): 559-565.

K

Kaden, J. J., S. Bickelhaupt, R. Grobholz, K. K. Haase, A. Sarikoc, R. Kilic, M. Brueckmann, S. Lang, I. Zahn, C. Vahl, S. Hagl, C. E. Dempfle and M. Borggreffe (2004). "Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification." J Mol Cell Cardiol **36**(1): 57-66.

Kaden, J. J., S. Bickelhaupt, R. Grobholz, C. F. Vahl, S. Hagl, M. Brueckmann, K. K. Haase, C.-E. Dempfle and M. Borggreffe (2004). "Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis." The Journal of heart valve disease **13**(4): 560-566.

Kadl, A., A. K. Meher, P. R. Sharma, M. Y. Lee, A. C. Doran, S. R. Johnstone, M. R. Elliott, F. Gruber, J. Han, W. Chen, T. Kensler, K. S. Ravichandran, B. E. Isakson, B. R. Wamhoff and N. Leitinger (2010). "Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids *via* Nrf2." Circ Res **107**(6): 737-746.

Kafienah, W., S. Mistry, M. J. Perry, G. Politopoulou and A. P. Hollander (2007). "Pharmacological regulation of adult stem cells: chondrogenesis can be induced using a synthetic inhibitor of the retinoic acid receptor." Stem Cells **25**(10): 2460-2468.

Kapustin, A. and C. M. Shanahan (2009). "Targeting vascular calcification: softening-up a hard target." Curr Opin Pharmacol **9**(2): 84-89.

Kapustin, A. N., J. D. Davies, J. L. Reynolds, R. McNair, G. T. Jones, A. Sidibe, L. J. Schurgers, J. N. Skepper, D. Proudfoot, M. Mayr and C. M. Shanahan (2011). "Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization." Circ Res **109**(1): e1-12.

Katz, R., N. D. Wong, R. Kronmal, J. Takasu, D. M. Shavelle, J. L. Probstfield, A. G. Bertoni, M. J. Budoff and K. D. O'Brien (2006). "Features of the metabolic syndrome and diabetes mellitus as predictors of aortic valve calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis." Circulation **113**(17): 2113-2119.

Ketteler, M., P. Bongartz, R. Westenfeld, J. E. Wildberger, A. H. Mahnken, R. Bohm, T. Metzger, C. Wanner, W. Jahnen-Dechent and J. Floege (2003). "Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study." Lancet **361**(9360): 827-833.

Kimble, R. B., S. Srivastava, F. P. Ross, A. Matayoshi and R. Pacifici (1996). "Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis *via* an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production." J Biol Chem **271**(46): 28890-28897.

King, K. E., V. P. Iyemere, P. L. Weissberg and C. M. Shanahan (2003). "Kruppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor

Bibliographie

beta 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype." J Biol Chem **278**(13): 11661-11669.

Klein, S., D. B. Allison, S. B. Heymsfield, D. E. Kelley, R. L. Leibel, C. Nonas, R. Kahn, M. Association for Weight, P. Obesity, T. O. S. Naaso, N. American Society for and A. American Diabetes (2007). "Waist circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, The Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association." Am J Clin Nutr **85**(5): 1197-1202.

Kolasa-Trela, R., T. Miszalski-Jamka, G. Grudzien, E. Wypasek and M. Kostkiewicz (2011). "Adiponectin, leptin, and resistin in patients with aortic stenosis without concomitant atherosclerotic vascular disease." Pol Arch Med Wewn **121**(10): 352-359.

Kolasa-Trela, R., T. Miszalski-Jamka, G. Grudzień, E. Wypasek and M. Kostkiewicz (2011). "Adiponectin, leptin, and resistin in patients with aortic stenosis without concomitant atherosclerotic vascular disease." Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej **121**(10): 352-359.

Konstantinov, I. E., N. Mejevoi and N. M. Anichkov (2006). "Nikolai N. Anichkov and his theory of atherosclerosis." Tex Heart Inst J **33**(4): 417-423.

L

Lacolley, P., V. Regnault, A. Nicoletti, Z. Li and J. B. Michel (2012). "The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles." Cardiovasc Res **95**(2): 194-204.

Lai, C. F., J. S. Shao, A. Behrmann, K. Krczma, S. L. Cheng and D. A. Towler (2012). "TNFR1-activated reactive oxidative species signals up-regulate osteogenic Msx2 programs in aortic myofibroblasts." Endocrinology **153**(8): 3897-3910.

Lambrecht, B. N. (2006). "Alveolar macrophage in the driver's seat." Immunity **24**(4): 366-368.

Latif, N., P. Sarathchandra, A. H. Chester and M. H. Yacoub (2015). "Expression of smooth muscle cell markers and co-activators in calcified aortic valves." Eur Heart J **36**(21): 1335-1345.

Latif, N., P. Sarathchandra, P. M. Taylor, J. Antoniwi and M. H. Yacoub (2005). "Molecules mediating cell-ECM and cell-cell communication in human heart valves." Cell Biochem Biophys **43**(2): 275-287.

Lee, H. Y., M. I. Dawson, G. L. Walsh, J. C. Nesbitt, R. L. Eckert, E. Fuchs, W. K. Hong, R. Lotan and J. M. Kurie (1996). "Retinoic acid receptor- and retinoid X receptor-selective retinoids activate signaling pathways that converge on AP-1 and inhibit squamous differentiation in human bronchial epithelial cells." Cell Growth Differ **7**(8): 997-1004.

Lee, J. K., J. Chung, G. T. Kannarkat and M. G. Tansey (2013). "Critical role of regulator G-protein signaling 10 (RGS10) in modulating macrophage M1/M2 activation." PLoS One **8**(11): e81785.

Bibliographie

Lee, S. H. and J. H. Choi (2016). "Involvement of Immune Cell Network in Aortic Valve Stenosis: Communication between Valvular Interstitial Cells and Immune Cells." Immune Netw **16**(1): 26-32.

Lee, S. J., K. W. Seo, M. R. Yun, S. S. Bae, W. S. Lee, K. W. Hong and C. D. Kim (2008). "4-Hydroxynonenal enhances MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via mitochondrial ROS-mediated activation of the Akt/NF-kappaB signaling pathways." Free Radic Biol Med **45**(10): 1487-1492.

Lefebvre, P., Y. Benomar and B. Staels (2010). "Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions." Trends Endocrinol Metab **21**(11): 676-683.

Leitinger, N. (2003). "Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **14**(5): 421-430.

Leopold, J. A. (2014). "MicroRNAs Regulate Vascular Medial Calcification." Cells **3**(4): 963-980.

Li, C., S. Xu and A. I. Gotlieb (2013). "The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops." Cardiovasc Pathol **22**(1): 1-8.

Li, L., J. C. Mamputu, N. Wiernsperger and G. Renier (2005). "Signaling pathways involved in human vascular smooth muscle cell proliferation and matrix metalloproteinase-2 expression induced by leptin: inhibitory effect of metformin." Diabetes **54**(7): 2227-2234.

Li, Q., Q. Jiang, L. J. Schurgers and J. Uitto (2007). "Pseudoxanthoma elasticum: reduced gamma-glutamyl carboxylation of matrix gla protein in a mouse model (Abcc6-/-)." Biochem Biophys Res Commun **364**(2): 208-213.

Li, X., H. Y. Yang and C. M. Giachelli (2008). "BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells." Atherosclerosis **199**(2): 271-277.

Lian, J. B., G. S. Stein, A. Javed, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, M. Montecino, M. Q. Hassan, T. Gaur, C. J. Lengner and D. W. Young (2006). "Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis." Rev Endocr Metab Disord **7**(1-2): 1-16.

Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-874.

Libby, P. and M. Aikawa (2002). "Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets." Nat Med **8**(11): 1257-1262.

Libby, P., M. Aikawa and U. Schonbeck (2000). "Cholesterol and atherosclerosis." Biochim Biophys Acta **1529**(1-3): 299-309.

Libby, P., D. Egan and S. Skarlatos (1997). "Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research." Circulation **96**(11): 4095-4103.

Libby, P., P. M. Ridker and A. Maseri (2002). "Inflammation and atherosclerosis." Circulation **105**(9): 1135-1143.

Lind, T., A. Sundqvist, L. Hu, G. Pejler, G. Andersson, A. Jacobson and H. Melhus (2013). "Vitamin A Is a Negative Regulator of Osteoblast Mineralization." PLoS ONE **8**(12).

Bibliographie

Lind, T., A. Sundqvist, L. Hu, G. Pejler, G. Andersson, A. Jacobson and H. Melhus (2013). "Vitamin a is a negative regulator of osteoblast mineralization." PLoS One **8**(12): e82388.

Littlewood, T. D. and M. R. Bennett (2003). "Apoptotic cell death in atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **14**(5): 469-475.

Liu, A. C., V. R. Joag and A. I. Gotlieb (2007). "The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology." Am J Pathol **171**(5): 1407-1418.

Liu, G.-Y., Q.-H. Liang, R.-R. Cui, Y. Liu, S.-S. Wu, P.-F. Shan, L.-Q. Yuan and E.-Y. Liao (2013). "Leptin Promotes the Osteoblastic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells From Female Mice by Increasing RANKL Expression." Endocrinology **155**(2): 558-567.

Liu, G. Y., Q. H. Liang, R. R. Cui, Y. Liu, S. S. Wu, P. F. Shan, L. Q. Yuan and E. Y. Liao (2014). "Leptin promotes the osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells from female mice by increasing RANKL expression." Endocrinology **155**(2): 558-567.

Liu, Y., H. Chen, D. Mu, D. Li, Y. Zhong, N. Jiang, Y. Zhang and M. Xia (2016). "Association of Serum Retinoic Acid With Risk of Mortality in Patients With Coronary Artery Disease." Circ Res **119**(4): 557-563.

Losi, M. A., G. Brevetti, V. Schiano, G. Barbati, V. Parisi, C. Contaldi, E. Chiacchio, M. Cavallaro, G. Carpinella, A. Fundaliois, L. S. Parrella, S. Betocchi, L. Brevetti and M. Chiariello (2010). "Aortic valve sclerosis in patients with peripheral and/or coronary arterial disease." Echocardiography **27**(6): 608-612.

Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-241.

Lutgens, E., E. D. de Muinck, P. J. Kitslaar, J. H. Tordoir, H. J. Wellens and M. J. Daemen (1999). "Biphasic pattern of cell turnover characterizes the progression from fatty streaks to ruptured human atherosclerotic plaques." Cardiovasc Res **41**(2): 473-479.

Lutgens, E., S. P. Lutgens, B. C. Faber, S. Heeneman, M. M. Gijbels, M. P. de Winther, P. Frederik, I. van der Made, A. Daugherty, A. M. Sijbers, A. Fisher, C. J. Long, P. Saftig, D. Black, M. J. Daemen and K. B. Cleutjens (2006). "Disruption of the cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation." Circulation **113**(1): 98-107.

M

Mackie, E. J., Y. A. Ahmed, L. Tatarczuch, K. S. Chen and M. Mirams (2008). "Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton." Int J Biochem Cell Biol **40**(1): 46-62.

Mahmut, A., M.-C. Boulanger, D. El Hussein, D. Fournier, R. Bouchareb, J.-P. Després, P. Pibarot, Y. Bossé and P. Mathieu (2014). "Elevated Expression of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 in Calcific Aortic Valve Disease: Implications for Valve Mineralization." Journal of the American College of Cardiology **63**(5): 460-469.

Mahmut, A., M. C. Boulanger, R. Bouchareb, F. Hadji and P. Mathieu (2015). "Adenosine derived from ecto-nucleotidases in calcific aortic valve disease promotes mineralization through A2a adenosine receptor." Cardiovasc Res **106**(1): 109-120.

Bibliographie

- Mallat, Z., H. Benamer, B. Hugel, J. Benessiano, P. G. Steg, J. M. Freyssinet and A. Tedgui (2000). "Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes." Circulation **101**(8): 841-843.
- Mann, J. M. and M. J. Davies (1996). "Vulnerable plaque. Relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries." Circulation **94**(5): 928-931.
- Manolescu, D.-C., M. Jankowski, B. A. Danalache, D. Wang, T. L. Broderick, J.-L. Chiasson and J. Gutkowska (2014). "All-trans retinoic acid stimulates gene expression of the cardioprotective natriuretic peptide system and prevents fibrosis and apoptosis in cardiomyocytes of obese ob/ob mice." Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism **39**(10): 1127-1136.
- Manzer, R., L. Qamar, T. Estey, A. Pappa, D. R. Petersen and V. Vasiliou (2003). "Molecular cloning and baculovirus expression of the rabbit corneal aldehyde dehydrogenase (ALDH1A1) cDNA." DNA Cell Biol **22**(5): 329-338.
- Martins, G. and K. Calame (2008). "Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes." Annu Rev Immunol **26**: 133-169.
- Massy, Z. A. and T. B. Drueke (2013). "Vascular calcification." Curr Opin Nephrol Hypertens **22**(4): 405-412.
- Massy, Z. A., R. Mentaverri, A. Mozar, M. Brazier and S. Kamel (2008). "The pathophysiology of vascular calcification: are osteoclast-like cells the missing link?" Diabetes Metab **34 Suppl 1**: S16-20.
- Mathieu, P. and M. C. Boulanger (2014). "Basic mechanisms of calcific aortic valve disease." Can J Cardiol **30**(9): 982-993.
- Mathieu, P., P. Voisine, A. Pepin, R. Shetty, N. Savard and F. Dagenais (2005). "Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity." J Heart Valve Dis **14**(3): 353-357.
- McEvoy, J. P., J. M. Meyer, D. C. Goff, H. A. Nasrallah, S. M. Davis, L. Sullivan, H. Y. Meltzer, J. Hsiao, T. Scott Stroup and J. A. Lieberman (2005). "Prevalence of the metabolic syndrome in patients with schizophrenia: baseline results from the Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) schizophrenia trial and comparison with national estimates from NHANES III." Schizophr Res **80**(1): 19-32.
- Mebius, R. E. and G. Kraal (2005). "Structure and function of the spleen." Nat Rev Immunol **5**(8): 606-616.
- Menini, S., C. Iacobini, C. Ricci, C. Blasetti Fantauzzi, L. Salvi, C. M. Pesce, M. Relucenti, G. Familiari, M. Taurino and G. Pugliese (2013). "The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis." Cardiovasc Res **100**(3): 472-480.
- Merad, M., N. Romani and G. Randolph (2008). "Langerhans cells at the interface of medicine, science, and industry." J Invest Dermatol **128**(2): 251-255.
- Merryman, W. D., H. D. Lukoff, R. A. Long, G. C. Engelmayr, Jr., R. A. Hopkins and M. S. Sacks (2007). "Synergistic effects of cyclic tension and transforming growth factor-beta1 on the aortic valve myofibroblast." Cardiovasc Pathol **16**(5): 268-276.

Bibliographie

Miano, J. M., S. Topouzis, M. W. Majesky and E. N. Olson (1996). "Retinoid receptor expression and all-trans retinoic acid-mediated growth inhibition in vascular smooth muscle cells." Circulation **93**(10): 1886-1895.

Michel, J. B., O. Thauinat, X. Houard, O. Meilhac, G. Caligiuri and A. Nicoletti (2007). "Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(6): 1259-1268.

Miller, J. D., Y. Chu, R. M. Brooks, W. E. Richenbacher, R. Pena-Silva and D. D. Heistad (2008). "Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans." J Am Coll Cardiol **52**(10): 843-850.

Miyauchi, Y., K. Ninomiya, H. Miyamoto, A. Sakamoto, R. Iwasaki, H. Hoshi, K. Miyamoto, W. Hao, S. Yoshida, H. Morioka, K. Chiba, S. Kato, T. Tokuhisa, M. Saitou, Y. Toyama, T. Suda and T. Miyamoto (2010). "The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis." J Exp Med **207**(4): 751-762.

Mohler, E. R., 3rd, F. Gannon, C. Reynolds, R. Zimmerman, M. G. Keane and F. S. Kaplan (2001). "Bone formation and inflammation in cardiac valves." Circulation **103**(11): 1522-1528.

Monteiro, M. C., B. Wdziekonski, P. Villageois, C. Vernochet, C. Lehle, N. Billon and C. Dani (2009). "Commitment of mouse embryonic stem cells to the adipocyte lineage requires retinoic acid receptor beta and active GSK3." Stem Cells Dev **18**(3): 457-463.

Monzack, E. L. and K. S. Masters (2011). "Can valvular interstitial cells become true osteoblasts? A side-by-side comparison." J Heart Valve Dis **20**(4): 449-463.

Moreno, P. R., L. Astudillo, S. Elmariah, K. R. Purushothaman, M. Purushothaman, P. A. Lento, S. K. Sharma, V. Fuster and D. H. Adams (2011). "Increased macrophage infiltration and neovascularization in congenital bicuspid aortic valve stenosis." J Thorac Cardiovasc Surg **142**(4): 895-901.

Morizaki, J. (1992). "[Experimental and clinical study on chorioamnionitis as a cause of preterm labor]." Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi **44**(1): 41-48.

Mosser, D. M. and X. Zhang (2008). "Activation of murine macrophages." Curr Protoc Immunol **Chapter 14**: Unit 14 12.

N

Naghavi, M., P. Libby, E. Falk, S. W. Casscells, S. Litovsky, J. Rumberger, J. J. Badimon, C. Stefanadis, P. Moreno, G. Pasterkamp, Z. Fayad, P. H. Stone, S. Waxman, P. Raggi, M. Madjid, A. Zarrabi, A. Burke, C. Yuan, P. J. Fitzgerald, D. S. Siscovick, C. L. de Korte, M. Aikawa, K. E. Juhani Airaksinen, G. Assmann, C. R. Becker, J. H. Chesebro, A. Farb, Z. S. Galis, C. Jackson, I. K. Jang, W. Koenig, R. A. Lodder, K. March, J. Demirovic, M. Navab, S. G. Priori, M. D. Reikhter, R. Bahr, S. M. Grundy, R. Mehran, A. Colombo, E. Boerwinkle, C. Ballantyne, W. Insull, Jr., R. S. Schwartz, R. Vogel, P. W. Serruys, G. K. Hansson, D. P. Faxon, S. Kaul, H. Drexler, P. Greenland, J. E. Muller, R. Virmani, P. M. Ridker, D. P. Zipes, P. K. Shah and J. T. Willerson (2003). "From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I." Circulation **108**(14): 1664-1672.

Nagy, E., D. C. Andersson, K. Caidahl, M. J. Eriksson, P. Eriksson, A. Franco-Cereceda, G. K. Hansson and M. Back (2011). "Upregulation of the 5-lipoxygenase pathway in human

Bibliographie

aortic valves correlates with severity of stenosis and leads to leukotriene-induced effects on valvular myofibroblasts." Circulation **123**(12): 1316-1325.

Nakamura, S., H. Ishibashi-Ueda, S. Niizuma, F. Yoshihara, T. Horio and Y. Kawano (2009). "Coronary calcification in patients with chronic kidney disease and coronary artery disease." Clin J Am Soc Nephrol **4**(12): 1892-1900.

Nallamshetty, S., H. Wang, E.-J. Rhee, F. W. Kiefer, J. D. Brown, S. Lotinun, P. Le, R. Baron, C. J. Rosen and J. Plutzky (2013). "Deficiency of retinaldehyde dehydrogenase 1 induces BMP2 and increases bone mass in vivo." PloS One **8**(8): e71307.

Napoli, C. (1997). "Low density lipoprotein oxidation and atherogenesis: from experimental models to clinical studies." G Ital Cardiol **27**(12): 1302-1314.

Napoli, C., F. P. D'Armiento, F. P. Mancini, A. Postiglione, J. L. Witztum, G. Palumbo and W. Palinski (1997). "Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions." J Clin Invest **100**(11): 2680-2690.

Neuville, P., Z. Yan, A. Gidlof, M. S. Pepper, G. K. Hansson, G. Gabbiani and A. Sirsjo (1999). "Retinoic acid regulates arterial smooth muscle cell proliferation and phenotypic features in vivo and *in vitro* through an RARalpha-dependent signaling pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(6): 1430-1436.

New, S. E. and E. Aikawa (2013). "Role of extracellular vesicles in de novo mineralization: an additional novel mechanism of cardiovascular calcification." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(8): 1753-1758.

Newby, A. C. (2007). "Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques." Trends Cardiovasc Med **17**(8): 253-258.

Ngo, D. T., A. L. Sverdlov and J. D. Horowitz (2012). "Prevention of aortic valve stenosis: a realistic therapeutic target?" Pharmacol Ther **135**(1): 78-93.

Niederhoffer, N., V. Marque, I. Lartaud-Idjouadiene, C. Duvivier, R. Peslin and J. Atkinson (1997). "Vasodilators, aortic elasticity, and ventricular end-systolic stress in nonanesthetized unrestrained rats." Hypertension **30**(5): 1169-1174.

Nigam, V. and D. Srivastava (2009). "Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells." J Mol Cell Cardiol **47**(6): 828-834.

Nishimura, R. A., C. M. Otto, R. O. Bonow, B. A. Carabello, J. P. Erwin, 3rd, R. A. Guyton, P. T. O'Gara, C. E. Ruiz, N. J. Skubas, P. Sorajja, T. M. Sundt, 3rd, J. D. Thomas and G. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice (2014). "2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines." J Am Coll Cardiol **63**(22): e57-185.

Nishimura, R. A., C. M. Otto, R. O. Bonow, B. A. Carabello, J. P. Erwin, 3rd, R. A. Guyton, P. T. O'Gara, C. E. Ruiz, N. J. Skubas, P. Sorajja, T. M. Sundt, 3rd, J. D. Thomas and G. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice (2014). "2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines." J Am Coll Cardiol **63**(22): 2438-2488.

Bibliographie

Nkomo, V. T., J. M. Gardin, T. N. Skelton, J. S. Gottdiener, C. G. Scott and M. Enriquez-Sarano (2006). "Burden of valvular heart diseases: a population-based study." Lancet **368**(9540): 1005-1011.

O

O'Donnell, C. J., M. Kavousi, A. V. Smith, S. L. Kardia, M. F. Feitosa, S. J. Hwang, Y. V. Sun, M. A. Province, T. Aspelund, A. Dehghan, U. Hoffmann, L. F. Bielak, Q. Zhang, G. Eiriksdottir, C. M. van Duijn, C. S. Fox, M. de Andrade, A. T. Kraja, S. Sigurdsson, S. E. Elias-Smale, J. M. Murabito, L. J. Launer, A. van der Lugt, S. Kathiresan, C. A. Consortium, G. P. Krestin, D. M. Herrington, T. D. Howard, Y. Liu, W. Post, B. D. Mitchell, J. R. O'Connell, H. Shen, A. R. Shuldiner, D. Altshuler, R. Elosua, V. Salomaa, S. M. Schwartz, D. S. Siscovick, B. F. Voight, J. C. Bis, N. L. Glazer, B. M. Psaty, E. Boerwinkle, G. Heiss, S. Blankenberg, T. Zeller, P. S. Wild, R. B. Schnabel, A. Schillert, A. Ziegler, T. F. Munzel, C. C. White, J. I. Rotter, M. Nalls, M. Oudkerk, A. D. Johnson, A. B. Newman, A. G. Uitterlinden, J. M. Massaro, J. Cunningham, T. B. Harris, A. Hofman, P. A. Peyser, I. B. Borecki, L. A. Cupples, V. Gudnason and J. C. Witteman (2011). "Genome-wide association study for coronary artery calcification with follow-up in myocardial infarction." Circulation **124**(25): 2855-2864.

Oda, A., T. Taniguchi and M. Yokoyama (2001). "Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration." Kobe J Med Sci **47**(3): 141-150.

Oksala, N., M. Levula, M. Peltö-Huikko, L. Kytömäki, J. T. Soini, J. Salenius, M. Kahonen, P. J. Karhunen, R. Laaksonen, S. Parkkila and T. Lehtimäki (2010). "Carbonic anhydrases II and XII are up-regulated in osteoclast-like cells in advanced human atherosclerotic plaques-Tampere Vascular Study." Ann Med **42**(5): 360-370.

Osnabrugge, R. L., D. Mylotte, S. J. Head, N. M. Van Mieghem, V. T. Nkomo, C. M. LeReun, A. J. Bogers, N. Piazza and A. P. Kappetein (2013). "Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study." J Am Coll Cardiol **62**(11): 1002-1012.

Otto, C. M., I. G. Burwash, M. E. Legget, B. I. Munt, M. Fujioka, N. L. Healy, C. D. Kraft, C. Y. Miyake-Hull and R. G. Schwaegler (1997). "Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome." Circulation **95**(9): 2262-2270.

Otto, C. M., J. Kuusisto, D. D. Reichenbach, A. M. Gown and K. D. O'Brien (1994). "Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies." Circulation **90**(2): 844-853.

P

Page, A., J. G. Dumesnil, M. A. Clavel, K. L. Chan, K. K. Teo, J. W. Tam, P. Mathieu, J. P. Despres, P. Pibarot and A. Investigators (2010). "Metabolic syndrome is associated with more pronounced impairment of left ventricle geometry and function in patients with calcific aortic stenosis: a substudy of the ASTRONOMER (Aortic Stenosis Progression Observation Measuring Effects of Rosuvastatin)." J Am Coll Cardiol **55**(17): 1867-1874.

Bibliographie

Parhami, F., Y. Tintut, A. Ballard, A. M. Fogelman and L. L. Demer (2001). "Leptin Enhances the Calcification of Vascular Cells Artery Wall as a Target of Leptin." Circulation Research **88**(9): 954-960.

Parhami, F., Y. Tintut, A. Ballard, A. M. Fogelman and L. L. Demer (2001). "Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin." Circ Res **88**(9): 954-960.

Parhami, F., Y. Tintut, J. K. Patel, N. Mody, A. Hemmat and L. L. Demer (2001). "Regulation of vascular calcification in atherosclerosis." Z Kardiol **90 Suppl 3**: 27-30.

Pawlak, M., P. Lefebvre and B. Staels (2012). "General molecular biology and architecture of nuclear receptors." Curr Top Med Chem **12**(6): 486-504.

Payne, G. A., M. C. Kohr and J. D. Tune (2012). "Epicardial perivascular adipose tissue as a therapeutic target in obesity-related coronary artery disease." British journal of pharmacology **165**(3): 659-669.

Pedersen, T. R. (2008). "Intensive lipid-lowering therapy for patients with aortic stenosis." Am J Cardiol **102**(11): 1571-1576.

Perrotta, I., F. M. Moraca, A. Sciangula, S. Aquila and S. Mazzulla (2015). "HIF-1alpha and VEGF: Immunohistochemical Profile and Possible Function in Human Aortic Valve Stenosis." Ultrastruct Pathol **39**(3): 198-206.

Pitsilos, S., J. Hunt, E. R. Mohler, A. M. Prabhakar, M. Poncz, J. Dawicki, T. Z. Khalapyan, M. L. Wolfe, R. Fairman, M. Mitchell, J. Carpenter, M. A. Golden, D. B. Cines and B. S. Sachais (2003). "Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters." Thromb Haemost **90**(6): 1112-1120.

Plump, A. and J. Madwed (2011). "Heart failure drug discovery: Scarred or ready for remodeling?" Journal of Molecular and Cellular Cardiology **51**(4): 444-448.

Q

Qiao, J. H., V. Mishra, M. C. Fishbein, S. K. Sinha and T. B. Rajavashisth (2015). "Multinucleated giant cells in atherosclerotic plaques of human carotid arteries: Identification of osteoclast-like cells and their specific proteins in artery wall." Exp Mol Pathol **99**(3): 654-662.

Qin, X., M. A. Corriere, L. M. Matrisian and R. J. Guzman (2006). "Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(7): 1510-1516.

Quinn, J. M. and M. T. Gillespie (2005). "Modulation of osteoclast formation." Biochem Biophys Res Commun **328**(3): 739-745.

R

Rabkin-Aikawa, E., M. Farber, M. Aikawa and F. J. Schoen (2004). "Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves." J Heart Valve Dis **13**(5): 841-847.

Bibliographie

Raij, L. (2006). "Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease." J Clin Hypertens (Greenwich) **8**(12 Suppl 4): 30-39.

Raines, E. W. and N. Ferri (2005). "Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease." J Lipid Res **46**(6): 1081-1092.

Rajamannan, N. M., F. J. Evans, E. Aikawa, K. J. Grande-Allen, L. L. Demer, D. D. Heistad, C. A. Simmons, K. S. Masters, P. Mathieu, K. D. O'Brien, F. J. Schoen, D. A. Towler, A. P. Yoganathan and C. M. Otto (2011). "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 **124**(16): 1783-1791.

Rajamannan, N. M., M. Subramaniam, D. Rickard, S. R. Stock, J. Donovan, M. Springett, T. Orszulak, D. A. Fullerton, A. J. Tajik, R. O. Bonow and T. Spelsberg (2003). "Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype." Circulation **107**(17): 2181-2184.

Rhee, E. J., S. Nallamshetty and J. Plutzky (2012). "Retinoid metabolism and its effects on the vasculature." Biochim Biophys Acta **1821**(1): 230-240.

Rodan, S. B. and G. A. Rodan (1997). "Integrin function in osteoclasts." J Endocrinol **154** Suppl: S47-56.

Roma-Lavisse, C., M. Tagzirt, C. Zawadzki, R. Lorenzi, A. Vincentelli, S. Haulon, F. Juthier, A. Rauch, D. Corseaux, B. Staels, B. Jude, E. Van Belle, S. Susen, G. Chinetti-Gbaguidi and A. Dupont (2015). "M1 and M2 macrophage proteolytic and angiogenic profile analysis in atherosclerotic patients reveals a distinctive profile in type 2 diabetes." Diab Vasc Dis Res **12**(4): 279-289.

Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.

Ruf, N., B. Uhlenberg, R. Terkeltaub, P. Nurnberg and F. Rutsch (2005). "The mutational spectrum of ENPP1 as arising after the analysis of 23 unrelated patients with generalized arterial calcification of infancy (GACI)." Hum Mutat **25**(1): 98.

Rusanescu, G., R. Weissleder and E. Aikawa (2008). "Notch signaling in cardiovascular disease and calcification." Current Cardiology Reviews **4**(3): 148-156.

S

Saftig, P., E. Hunziker, O. Wehmeyer, S. Jones, A. Boyde, W. Rommerskirch, J. D. Moritz, P. Schu and K. von Figura (1998). "Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13453-13458.

Schafer, C., A. Heiss, A. Schwarz, R. Westenfeld, M. Ketteler, J. Floege, W. Muller-Esterl, T. Schinke and W. Jahnke-Dechent (2003). "The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification." J Clin Invest **112**(3): 357-366.

Bibliographie

- Schafer, K., M. Halle, C. Goeschen, C. Dellas, M. Pynn, D. J. Loskutoff and S. Konstantinides (2004). "Leptin promotes vascular remodeling and neointimal growth in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(1): 112-117.
- Schaub, F. J., W. C. Liles, N. Ferri, K. Sayson, R. A. Seifert and D. F. Bowen-Pope (2003). "Fas and Fas-associated death domain protein regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression by human smooth muscle cells through caspase- and calpain-dependent release of interleukin-1alpha." Circ Res **93**(6): 515-522.
- Schiffrin, E. L., M. L. Lipman and J. F. Mann (2007). "Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system." Circulation **116**(1): 85-97.
- Schmidt, A. M., S. D. Yan, J. L. Wautier and D. Stern (1999). "Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis." Circ Res **84**(5): 489-497.
- Schroeter, M. R., J. Schneiderman, B. Schumann, R. Glückermann, P. Grimmas, A. B. Buchwald, T. Tirilomis, F. A. Schön-dube, S. V. Konstantinides and K. Schäfer (2007). "Expression of the leptin receptor in different types of vascular lesions." Histochemistry and cell biology **128**(4): 323-333.
- Schwartz, S. M. and C. E. Murry (1998). "Proliferation and the monoclonal origins of atherosclerotic lesions." Annu Rev Med **49**: 437-460.
- Seimon, T. and I. Tabas (2009). "Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis." J Lipid Res **50 Suppl**: S382-387.
- Shanahan, C. M. (2007). "Inflammation ushers in calcification: a cycle of damage and protection?" Circulation **116**(24): 2782-2785.
- Shanker, J., V. S. Rao, V. Ravindran, B. Dhanalakshmi, S. Hebbagodi and V. Kakkar (2012). "Relationship of adiponectin and leptin to coronary artery disease, classical cardiovascular risk factors and atherothrombotic biomarkers in the IARS cohort." Thrombosis and Haemostasis **108**(4): 769-780.
- Sherr, C. J., C. W. Rettenmier, R. Sacca, M. F. Roussel, A. T. Look and E. R. Stanley (1985). "The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1." Cell **41**(3): 665-676.
- Shi, L. M., J. W. Tao, X. B. Qiu, J. Wang, F. Yuan, L. Xu, H. Liu, R. G. Li, Y. J. Xu, Q. Wang, H. Z. Zheng, X. Li, X. Z. Wang, M. Zhang, X. K. Qu and Y. Q. Yang (2014). "GATA5 loss-of-function mutations associated with congenital bicuspid aortic valve." Int J Mol Med **33**(5): 1219-1226.
- Shimada, T., M. Kakitani, Y. Yamazaki, H. Hasegawa, Y. Takeuchi, T. Fujita, S. Fukumoto, K. Tomizuka and T. Yamashita (2004). "Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism." J Clin Invest **113**(4): 561-568.
- Shimono, K., W. E. Tung, C. Macolino, A. H. Chi, J. H. Didizian, C. Mundy, R. A. Chandraratna, Y. Mishina, M. Enomoto-Iwamoto, M. Pacifici and M. Iwamoto (2011). "Potent inhibition of heterotopic ossification by nuclear retinoic acid receptor-gamma agonists." Nat Med **17**(4): 454-460.

Bibliographie

Simmons, C. A., G. R. Grant, E. Manduchi and P. F. Davies (2005). "Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves." Circ Res **96**(7): 792-799.

Singh, M., U. S. Bedi, P. P. Singh, R. Arora and S. Khosla (2010). "Leptin and the clinical cardiovascular risk." Int J Cardiol **140**(3): 266-271.

Sliwa, K., M. Carrington, B. M. Mayosi, E. Zigiriadis, R. Mvungi and S. Stewart (2010). "Incidence and characteristics of newly diagnosed rheumatic heart disease in urban African adults: insights from the heart of Soweto study." Eur Heart J **31**(6): 719-727.

Smith, J. G., K. Luk, C. A. Schulz, J. C. Engert, R. Do, G. Hindy, G. Rukh, L. Dufresne, P. Almgren, D. S. Owens, T. B. Harris, G. M. Peloso, K. F. Kerr, Q. Wong, A. V. Smith, M. J. Budoff, J. I. Rotter, L. A. Cupples, S. Rich, S. Kathiresan, M. Orho-Melander, V. Gudnason, C. J. O'Donnell, W. S. Post, G. Thanassoulis, H. Cohorts for and G. Aging Research in Genetic Epidemiology Extracoronary Calcium Working (2014). "Association of low-density lipoprotein cholesterol-related genetic variants with aortic valve calcium and incident aortic stenosis." JAMA **312**(17): 1764-1771.

Soini, Y., T. Salo and J. Satta (2003). "Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis." Hum Pathol **34**(8): 756-763.

Speer, M. Y., Y.-C. Chien, M. Quan, H.-Y. Yang, H. Vali, M. D. McKee and C. M. Giachelli (2005). "Smooth muscle cells deficient in osteopontin have enhanced susceptibility to calcification *in vitro*." Cardiovascular Research **66**(2): 324-333.

Speer, M. Y. and C. M. Giachelli (2004). "Regulation of cardiovascular calcification." Cardiovasc Pathol **13**(2): 63-70.

Speer, M. Y., M. D. McKee, R. E. Guldberg, L. Liaw, H. Y. Yang, E. Tung, G. Karsenty and C. M. Giachelli (2002). "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 **196**(8): 1047-1055.

Speer, M. Y., H. Y. Yang, T. Brabb, E. Leaf, A. Look, W. L. Lin, A. Frutkin, D. Dichek and C. M. Giachelli (2009). "Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries." Circ Res **104**(6): 733-741.

St Hilaire, C., S. G. Ziegler, T. C. Markello, A. Brusco, C. Groden, F. Gill, H. Carlson-Donohoe, R. J. Lederman, M. Y. Chen, D. Yang, M. P. Siegenthaler, C. Arduino, C. Mancini, B. Freudenthal, H. C. Stanescu, A. A. Zdebik, R. K. Chaganti, R. L. Nussbaum, R. Kleta, W. A. Gahl and M. Boehm (2011). "NT5E mutations and arterial calcifications." N Engl J Med **364**(5): 432-442.

Stary, H. C. (2000). "Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(5): 1177-1178.

Stary, H. C. (2000). "Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression." Z Kardiol **89 Suppl 2**: 28-35.

Stary, H. C., A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler (1995). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(9): 1512-1531.

Bibliographie

Stary, H. C., A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler (1995). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **92**(5): 1355-1374.

Stary, H. C., A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **89**(5): 2462-2478.

Steinberg, D. (2002). "Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime." Nat Med **8**(11): 1211-1217.

Steiner, I., P. Kasparova, A. Kohout and J. Dominik (2007). "Bone formation in cardiac valves: a histopathological study of 128 cases." Virchows Arch **450**(6): 653-657.

Steitz, S. A., M. Y. Speer, G. Curinga, H. Y. Yang, P. Haynes, R. Aebbersold, T. Schinke, G. Karsenty and C. M. Giachelli (2001). "Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers." Circ Res **89**(12): 1147-1154.

Stewart, B. F., D. Siscovick, B. K. Lind, J. M. Gardin, J. S. Gottdiener, V. E. Smith, D. W. Kitzman and C. M. Otto (1997). "Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study." J Am Coll Cardiol **29**(3): 630-634.

Stoger, J. L., M. J. Gijbels, S. van der Velden, M. Manca, C. M. van der Loos, E. A. Biessen, M. J. Daemen, E. Lutgens and M. P. de Winther (2012). "Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis." Atherosclerosis **225**(2): 461-468.

Storms, R. W., P. D. Green, K. M. Safford, D. Niedzwiecki, C. R. Cogle, O. M. Colvin, N. J. Chao, H. E. Rice and C. A. Smith (2005). "Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34." Blood **106**(1): 95-102.

Stout, K. K. and C. M. Otto (2007). "Indications for aortic valve replacement in aortic stenosis." J Intensive Care Med **22**(1): 14-25.

Suda, T., N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M. T. Gillespie and T. J. Martin (1999). "Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families." Endocr Rev **20**(3): 345-357.

Sugiyama, S., K. Kugiyama, M. Aikawa, S. Nakamura, H. Ogawa and P. Libby (2004). "Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(7): 1309-1314.

T

Takayanagi, H., S. Kim, T. Koga, H. Nishina, M. Isshiki, H. Yoshida, A. Saiura, M. Isobe, T. Yokochi, J. Inoue, E. F. Wagner, T. W. Mak, T. Kodama and T. Taniguchi (2002). "Induction

Bibliographie

and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts." Dev Cell **3**(6): 889-901.

Takei, A., Y. Huang and M. F. Lopes-Virella (2001). "Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL." Atherosclerosis **154**(1): 79-86.

Tang, S. Y., R. P. Herber, S. P. Ho and T. Alliston (2012). "Matrix metalloproteinase-13 is required for osteocytic perilacunar remodeling and maintains bone fracture resistance." J Bone Miner Res **27**(9): 1936-1950.

Tang, X. H. and L. J. Gudas (2011). "Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer." Annu Rev Pathol **6**: 345-364.

Taylor, P. M., S. P. Allen and M. H. Yacoub (2000). "Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin." J Heart Valve Dis **9**(1): 150-158.

Taylor, P. M., P. Batten, N. J. Brand, P. S. Thomas and M. H. Yacoub (2003). "The cardiac valve interstitial cell." The international journal of biochemistry & cell biology **35**(2): 113-118.

Tedgui, A. and Z. Mallat (2001). "Apoptosis as a determinant of atherothrombosis." Thromb Haemost **86**(1): 420-426.

Tedgui, A. and Z. Mallat (2006). "Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways." Physiol Rev **86**(2): 515-581.

Thanassoulis, G., C. Y. Campbell, D. S. Owens, J. G. Smith, A. V. Smith, G. M. Peloso, K. F. Kerr, S. Pechlivanis, M. J. Budoff, T. B. Harris, R. Malhotra, K. D. O'Brien, P. R. Kamstrup, B. G. Nordestgaard, A. Tybjaerg-Hansen, M. A. Allison, T. Aspelund, M. H. Criqui, S. R. Heckbert, S. J. Hwang, Y. Liu, M. Sjogren, J. van der Pals, H. Kalsch, T. W. Muhleisen, M. M. Nothen, L. A. Cupples, M. Caslake, E. Di Angelantonio, J. Danesh, J. I. Rotter, S. Sigurdsson, Q. Wong, R. Erbel, S. Kathiresan, O. Melander, V. Gudnason, C. J. O'Donnell, W. S. Post and C. E. C. W. Group (2013). "Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis." N Engl J Med **368**(6): 503-512.

Thompson, M. E., J. K. Nelson, C. McMaster, M. C. Stewart, M. D. Shields and M. Ennis (1997). "Risk factors for bronchiolitis: Presentation of an on-going prospective clinical study." Inflamm Res **46**(Suppl 1): 85-86.

Tintut, Y., J. Patel, M. Territo, T. Saini, F. Parhami and L. L. Demer (2002). "Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification *in vitro*." Circulation **105**(5): 650-655.

Townsend, N., L. Wilson, P. Bhatnagar, K. Wickramasinghe, M. Rayner and M. Nichols (2016). "Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016." Eur Heart J.

U

Udagawa, N., N. Takahashi, T. Akatsu, H. Tanaka, T. Sasaki, T. Nishihara, T. Koga, T. J. Martin and T. Suda (1990). "Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(18): 7260-7264.

Bibliographie

V

Vaananen, H. K., H. Zhao, M. Mulari and J. M. Halleen (2000). "The cell biology of osteoclast function." J Cell Sci **113 (Pt 3)**: 377-381.

Van Gaal, L. F., I. L. Mertens and C. E. De Block (2006). "Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease." Nature **444(7121)**: 875-880.

Venardos, N., N. A. Nadlonek, Q. Zhan, M. J. Weyant, T. B. Reece, X. Meng and D. A. Fullerton (2014). "Aortic valve calcification is mediated by a differential response of aortic valve interstitial cells to inflammation." J Surg Res **190(1)**: 1-8.

Verreck, F. A., T. de Boer, D. M. Langenberg, M. A. Hoeve, M. Kramer, E. Vaisberg, R. Kastelein, A. Kolk, R. de Waal-Malefyt and T. H. Ottenhoff (2004). "Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **101(13)**: 4560-4565.

Virmani, R., A. P. Burke, A. Farb and F. D. Kolodgie (2002). "Pathology of the unstable plaque." Prog Cardiovasc Dis **44(5)**: 349-356.

Virmani, R., F. D. Kolodgie, A. P. Burke, A. Farb and S. M. Schwartz (2000). "Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20(5)**: 1262-1275.

Visconti, R. P., Y. Ebihara, A. C. LaRue, P. A. Fleming, T. C. McQuinn, M. Masuya, H. Minamiguchi, R. R. Markwald, M. Ogawa and C. J. Drake (2006). "An in vivo analysis of hematopoietic stem cell potential: hematopoietic origin of cardiac valve interstitial cells." Circ Res **98(5)**: 690-696.

W

Wallace, A. M., A. D. McMahon, C. J. Packard, A. Kelly, J. Shepherd, A. Gaw and N. Sattar (2001). "Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS)." Circulation **104(25)**: 3052-3056.

Wang, M. F., C. L. Han and S. J. Yin (2009). "Substrate specificity of human and yeast aldehyde dehydrogenases." Chem Biol Interact **178(1-3)**: 36-39.

Wang, R., W. Chen, Z. Ma, L. Li and X. Chen (2014). "M1/M2 macrophages and associated mechanisms in congenital bicuspid aortic valve stenosis." Exp Ther Med **7(4)**: 935-940.

Warnock, J. N., B. Nanduri, C. A. Pregonero Gamez, J. Tang, D. Koback, W. M. Muir and S. C. Burgess (2011). "Gene Profiling of Aortic Valve Interstitial Cells under Elevated Pressure Conditions: Modulation of Inflammatory Gene Networks." International Journal of Inflammation **2011**.

Wei, S., M. W. Wang, S. L. Teitelbaum and F. P. Ross (2002). "Interleukin-4 reversibly inhibits osteoclastogenesis via inhibition of NF-kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling." J Biol Chem **277(8)**: 6622-6630.

Weiss, R. M., D. D. Lund, Y. Chu, R. M. Brooks, K. A. Zimmerman, R. El Accaoui, M. K. Davis, G. P. Hajj, M. B. Zimmerman and D. D. Heistad (2013). "Osteoprotegerin inhibits

Bibliographie

aortic valve calcification and preserves valve function in hypercholesterolemic mice." PLoS One **8**(6): e65201.

West, X. Z., N. L. Malinin, A. A. Merkulova, M. Tischenko, B. A. Kerr, E. C. Borden, E. A. Podrez, R. G. Salomon and T. V. Byzova (2010). "Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands." Nature **467**(7318): 972-976.

Westendorf, J. J., R. A. Kahler and T. M. Schroeder (2004). "Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases." Gene **341**: 19-39.

Willis, M. S., L. W. Klassen, D. L. Carlson, C. F. Brouse and G. M. Thiele (2004). "Malondialdehyde-acetaldehyde haptenated protein binds macrophage scavenger receptor(s) and induces lysosomal damage." Int Immunopharmacol **4**(7): 885-899.

Wilson, P. W., L. I. Kauppila, C. J. O'Donnell, D. P. Kiel, M. Hannan, J. M. Polak and L. A. Cupples (2001). "Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality." Circulation **103**(11): 1529-1534.

Wirrig, E. E., M. V. Gomez, R. B. Hinton and K. E. Yutzey (2015). "COX2 Inhibition Reduces Aortic Valve Calcification In Vivo." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology: ATVB **15**: 114.305159.

Witteman, J. C., D. E. Grobbee, F. J. Kok, A. Hofman and H. A. Valkenburg (1989). "Increased risk of atherosclerosis in women after the menopause." BMJ **298**(6674): 642-644.

Woods, A., E. S. Oh and J. R. Couchman (1998). "Syndecan proteoglycans and cell adhesion." Matrix Biol **17**(7): 477-483.

Wu, L. N., Y. Ishikawa, D. Nie, B. R. Genge and R. E. Wuthier (1997). "Retinoic acid stimulates matrix calcification and initiates type I collagen synthesis in primary cultures of avian weight-bearing growth plate chondrocytes." J Cell Biochem **65**(2): 209-230.

Wyss, K., C. Y. Yip, Z. Mirzaei, X. Jin, J. H. Chen and C. A. Simmons (2012). "The elastic properties of valve interstitial cells undergoing pathological differentiation." J Biomech **45**(5): 882-887.

X

Xing, Y., J. N. Warnock, Z. He, S. L. Hilbert and A. P. Yoganathan (2004). "Cyclic pressure affects the biological properties of porcine aortic valve leaflets in a magnitude and frequency dependent manner." Ann Biomed Eng **32**(11): 1461-1470.

Xu, J.-C., G.-H. Wu, H.-L. Liu, J.-T. Liu, X.-J. Yan and J.-T. Chen (2010). "The effect of leptin on the osteoinductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in nude mice." Saudi medical journal **31**(6): 615-621.

Yamanouchi, D., Y. Takei and K. Komori (2012). "Balanced mineralization in the arterial system: possible role of osteoclastogenesis/osteoblastogenesis in abdominal aortic aneurysm and stenotic disease." Circ J **76**(12): 2732-2737.

Yao, Q., R. Song, L. Ao, Q. Zhan, J. C. Cleveland, X. Yu, D. A. Fullerton and X. Meng (2015). "Over-expression of neurotrophin 3 in human aortic valves affected by calcific

Bibliographie

disease induces the osteogenic responses *via* the Trk-Akt pathway." Biochimica Et Biophysica Acta **1852**(9): 1940-1949.

Y

Yetkin, E. and J. Waltenberger (2009). "Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis." Int J Cardiol **135**(1): 4-13.

Yip, C. Y., J. H. Chen, R. Zhao and C. A. Simmons (2009). "Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(6): 936-942.

Yoshida, A. (1992). "Molecular genetics of human aldehyde dehydrogenase." Pharmacogenetics **2**(4): 139-147.

Yoshioka, M., S. Yuasa, K. Matsumura, K. Kimura, T. Shiomi, N. Kimura, C. Shukunami, Y. Okada, M. Mukai, H. Shin, R. Yozu, M. Sata, S. Ogawa, Y. Hiraki and K. Fukuda (2006). "Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis." Nat Med **12**(10): 1151-1159.

Yu, Y. C., J. R. Boston, M. A. Simaan and J. F. Antaki (2001). "Minimally invasive estimation of systemic vascular parameters." Ann Biomed Eng **29**(7): 595-606.

Yu, Z., K. Seya, K. Daitoku, S. Motomura, I. Fukuda and K. Furukawa (2011). "Tumor necrosis factor-alpha accelerates the calcification of human aortic valve interstitial cells obtained from patients with calcific aortic valve stenosis *via* the BMP2-Dlx5 pathway." J Pharmacol Exp Ther **337**(1): 16-23.

Yuan, Z. S., Y. Z. Zhou, X. B. Liao, J. W. Luo, K. J. Shen, Y. R. Hu, L. Gu, J. M. Li, C. M. Tan, H. M. Chen and X. M. Zhou (2015). "Apelin attenuates the osteoblastic differentiation of aortic valve interstitial cells *via* the ERK and PI3-K/Akt pathways." Amino Acids: 1-8.

Z

Zalewski, A., Y. Shi and A. G. Johnson (2002). "Diverse origin of intimal cells: smooth muscle cells, myofibroblasts, fibroblasts, and beyond?" Circ Res **91**(8): 652-655.

Zeadin, M., M. Butcher, G. Werstuck, M. Khan, C. K. Yee and S. G. Shaughnessy (2009). "Effect of leptin on vascular calcification in apolipoprotein E-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(12): 2069-2075.

Zeadin, M., M. Butcher, G. Werstuck, M. Khan, C. K. Yee and S. G. Shaughnessy (2009). "Effect of Leptin on Vascular Calcification in Apolipoprotein E-Deficient Mice." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **29**(12): 2069-2075.

Zeadin, M. G., M. K. Butcher, S. G. Shaughnessy and G. H. Werstuck (2012). "Leptin promotes osteoblast differentiation and mineralization of primary cultures of vascular smooth muscle cells by inhibiting glycogen synthase kinase (GSK)-3beta." Biochem Biophys Res Commun **425**(4): 924-930.

Bibliographie

- Zeadin, M. G., M. K. Butcher, S. G. Shaughnessy and G. H. Werstuck (2012). "Leptin promotes osteoblast differentiation and mineralization of primary cultures of vascular smooth muscle cells by inhibiting glycogen synthase kinase (GSK)-3 β ." Biochemical and biophysical research communications **425**(4): 924-930.
- Zeidan, A., D. M. Purdham, V. Rajapurohitam, S. Javadov, S. Chakrabarti and M. Karmazyn (2005). "Leptin induces vascular smooth muscle cell hypertrophy through angiotensin II- and endothelin-1-dependent mechanisms and mediates stretch-induced hypertrophy." J Pharmacol Exp Ther **315**(3): 1075-1084.
- Zeiber, A. M., V. Schachinger and J. Minners (1995). "Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function." Circulation **92**(5): 1094-1100.
- Zeng, R., C. H. Xu, Y. N. Xu, Y. L. Wang and M. Wang (2014). "Association of leptin levels with pathogenetic risk of coronary heart disease and stroke: a meta-analysis." Arg Bras Endocrinol Metabol **58**(8): 817-823.
- Zhang, X.-W., B.-Y. Zhang, S.-W. Wang, D.-J. Gong, L. Han, Z.-Y. Xu and X.-H. Liu (2014). "Twist-related protein 1 negatively regulated osteoblastic transdifferentiation of human aortic valve interstitial cells by directly inhibiting runt-related transcription factor 2." The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery **148**(4): 1700-1708.e1701.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.
- Zhao, B., M. Takami, A. Yamada, X. Wang, T. Koga, X. Hu, T. Tamura, K. Ozato, Y. Choi, L. B. Ivashkiv, H. Takayanagi and R. Kamijo (2009). "Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis." Nat Med **15**(9): 1066-1071.
- Zhu, T., Y. H. Gan and H. Liu (2012). "Functional evaluation of mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene." Chin J Dent Res **15**(2): 99-104.

Annexes

Leptin induces osteoblast differentiation of human valvular interstitial cells *via* the Akt and ERK pathways

Mickael Rosa^a, Camille Paris^{a, b}, Yoann Sottejeau^a, Delphine Corseaux^a, Emmanuel Robin^{a, b}, Madjid Tagzirt^a, Francis Juthier^{a, b}, Ramadan Jashari^c, Antoine Rauch^{a, b}, André Vincentelli^a, Bart Staels^a, Eric Van Belle^{a, b}, Sophie Susen^{a, b*}, Annabelle Dupont^{a, b}

a. European Genomic Institute for Diabetes (E.G.I.D.), FR 3508, UNIV LILLE, Inserm UMR 1011; Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

b. Cardiovascular and Pulmonary, and Haematology Department, CHRU de Lille, Lille, France

c. European Homograft Bank, c/o Military Hospital Queen Astrid, Brussels, Belgium

*. Corresponding author

^{a, b, c} This author takes responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

Corresponding author :

Pr. Sophie Susen, INSERM U 1011, Amphi J&K - Boulevard du Professeur Jules Leclercq, 59008 Lille cedex, France, E-mail : sophiesusen@aol.com, Phone: +33-3-20-62-35-70

Acknowledgments of grant support :

This work was supported by the Fondation de France and the Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA).

Disclosures : None

Keywords : Calcific aortic valve disease; leptin; human valvular interstitial cells; osteoblast differentiation

Abstract

Background: Calcific aortic valve disease (CAVD) affects 2 to 6% of the population over 65 years and results, in part, from the osteoblast differentiation of human valvular interstitial cells (VICs). This study aims to elucidate the effects of leptin on osteoblast phenotype of VICs and the signalling pathways involved.

Methods: Patients who underwent aortic valve replacement for CAVD (n=43) were included in this study. Patients with coronary artery disease (CAD) without CAVD (n=129) were used as controls. Leptin was quantified in calcific aortic valves and blood samples. Leptin receptor expression was analysed in aortic valves and isolated VICs. The effects of leptin on human VICs osteoblast differentiation were investigated by alkaline phosphatase (ALP) activity measurement and RT-qPCR analysis for osteopontin, ALP, BMP-2 and RUNX2.

Results: Patients with CAVD had higher serum leptin concentrations than CAD patients ($p=0.002$). Leptin was found in calcific aortic valves, with higher concentrations in calcified vs non-calcified zones ($p=0.01$). Chronic leptin stimulation of VICs enhanced ALP activity and ALP, BMP-2 and RUNX2 expression and decreased osteopontin expression. Moreover, inhibiting Akt or ERK during leptin stimulation lowered the expression of osteoblast markers in VIC.

Conclusions: Taken together, these findings indicate that leptin plays a critical role in CAVD development by promoting osteoblast differentiation of human aortic VICs in an Akt and ERK dependant manner. This study provides new insights into the pathogenesis of CAVD and suggests that reducing circulating leptin levels or blocking leptin actions on VICs could be promising therapeutic strategies for CAVD.

1. Introduction

Calcific aortic valve disease (CAVD) is the most common valvular heart disease in adults, affecting 2 to 6% of people over 65 years [1]. First described as a passive, degenerative process related to repetitive high mechanical stress, it is now clear that CAVD is an atherosclerosis-like disease mediated by a complex interplay between inflammation, lipid deposition, fibrosis and calcification [2, 3]. Valvular interstitial cells (VICs) are the most prevalent cells found in human aortic valves and play a major role in tissue homeostasis and valve function [4]. These cells represent a heterogeneous and dynamic cell population composed of progenitor cells, quiescent cells, activated cells and osteoblast-like cells [5]. Recent studies have suggested that this latter cell phenotype could play an important role in valve calcification, a hallmark of CAVD [3, 6]. Leptin, the product of the OB gene, is a 16 kDa adipokine [7]. Initially described as a central satiety signal, many studies since reported pleiotropic effects of leptin and hyperleptinemia has been identified as a risk factor for cardiovascular diseases such as atherosclerotic coronary artery disease (CAD) [8, 9]. In humans, 2 major leptin receptor isoforms are expressed. The long form of the receptor (ObR-L) mediates the transducing signals of leptin whereas the short isoform (ObR-S), described as signalling inactive, is implicated in the transport and degradation of leptin [10]. In 2009, Zeadin *et al* showed that chronic leptin treatment enhanced calcification in the aortic valve of ApoE^{-/-} mice and then that leptin could promote osteoblastic differentiation of human vascular smooth muscle cells in primary culture [11, 12]. Moreover, one study recently described that leptin is expressed in human calcific aortic valves and may promote calcification of human VICs in culture [13]. However, the molecular mechanisms involved in this process remain unclear.

The aims of this study were 1) to investigate the associations between circulating leptin concentrations, CAVD presence and leptin and its receptors concentrations in calcified and non calcified areas in aortic valves from CAVD patients and 2) to elucidate the effects of leptin on osteoblast differentiation of VICs and the signalling pathways *via* which leptin exerts its effects on human VICs.

2. Methods

2. 1 Study population

Patients were recruited at the cardiovascular surgery department of the CHRU of Lille, France. The study protocol, conform to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki, was approved by the local ethics committee (ATHERAO study, CPP2008_13/0839). Informed consent was obtained from each included patient.

A total of 43 consecutive patients who underwent aortic valve replacement for severe CAVD (according AHA guidelines [1]) and without concomitant severe coronary artery disease (CAD) (defined as a stenosis of >75% in ≥ 1 of the main coronary arteries on angiography) were selected. Each CAVD patient was matched, according to age (± 1 year) and sex, to 3 patients with CAD recruited at the cardiology department (n=129). None of the CAD patients presented CAVD, as verified by echocardiography. For all patients, data included Body Mass Index (BMI), smoking history (current or smoking cessation less than 1 year vs. smoking cessation >1 year or never smoker), diabetes mellitus (fasting glucose ≥ 126 mg/dl, use of glucose-lowering agents, or a history of physician-diagnosed diabetes mellitus), dyslipidemia (hypercholesterolemia, defined as fasting serum total cholesterol >220 mg/dl and/or low-density lipoprotein cholesterol >140 mg/dl and/or hypercholesterolemia treatment, and/or hypertriglyceridemia defined as serum triglycerides ≥ 150 mg/dl

and/or hypertriglyceridemia treatment), arterial hypertension (blood pressure $\geq 140/90$ mmHg or use of antihypertensive drugs) and current medications.

2.2 Serum leptin concentrations

After overnight fasting, blood samples were collected from all the study subjects, by venipuncture, in the morning and before any intervention. Serum samples were stored at -80°C until analysis. Free leptin concentrations were assessed by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.3 Collection and processing of human aortic valves

Explanted valves of the CAVD group were collected at the time of surgery.

Immediately after valve explantation, leaflets were rinsed in saline. One leaflet was dedicated to histological and immunohistological analysis. On another leaflet, the non-calcified zone was separated from the macroscopic calcifications. The remaining tissue was used for VICs isolation.

2.4 Histological and immunohistochemical staining

One leaflet was snap-frozen in liquid nitrogen and then embedded in OCT compound (CellPath, Newtown, Wales, UK), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Serial cryosections ($10\mu\text{m}$) of the leaflet portion were made with a CM3050S microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) onto Superfrost slides and air-dried at room temperature for 30 minutes.

Serial sections were stained 2 min with Alizarin Red S 1%, pH 6.36-6.40 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for ionized calcium deposits. Adjacent sections of aortic valves were examined for the presence of leptin (polyclonal rabbit anti-human, clone A-20, 1/50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and leptin receptor recognizing the short and long forms (polyclonal rabbit anti-human, clone H-300, 1/50, Santa Cruz Biotechnology). Briefly, slides were washed in PBS 1X buffer.

Sections were fixed in a paraformaldehyde 4% solution according to R&D systems protocol for immunofluorescence. Blocking serum (3% normal rabbit serum, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was added and incubated for 30 minutes, followed by incubation with primary antibody overnight at 4°C. After vigorous washing, a mixture of secondary antibodies (a11012, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was added and incubated for 60 minutes. Secondary antibody alone served as a control. The slides were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma-Aldrich) before mounting and inspection by CX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

2.5 Preparation of valve homogenates

For protein analysis of calcified and non-calcified zones of valves, 100 mg of tissue were homogenized in 500 µl extraction buffer (20 mM Tris–HCl, 0.5% Nonidet NP40) at 4 °C with a high-speed homogenizer (Ultra-Turrax T25, Ika-Labortechnik, Staufen, Germany). After centrifugation (15 min, 3300 × g, 4 °C), the supernatants were aliquoted and frozen at -80 °C. Total protein concentration was determined using the Pierce BCA protein assay kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Free leptin was quantified in aortic valve homogenates of “non-calcified zone” and “calcified zone” by ELISA assays (R&D Systems) according to the manufacturer's procedures.

The same amount of tissue was homogenized in 1 ml of TRIzol for RNA extraction (Life Technologies), processed according to the Chomczynski and Sacchi procedure and stored at -80°C until analysis [14].

2. 6 Aortic valvular interstitial cell culture

VICs were isolated by type-I collagenase digestion and were cultured in Smooth Muscle Cell Basal Medium 2 (Promocell, Heidelberg, Germany) containing 0.5 ng/ml

human EGF, 2 ng/ml human bFGF, 5µg/ml insulin, 2% penicillin, 1% fungizone and 5% foetal calf serum. Cells were incubated at 37°C in 5% CO₂. The culture media were replaced every 2-3 days and cells were passaged when reaching 80-90% confluence. All experiments were performed on VICs at passage 3-5. VICs were stimulated with human recombinant leptin (Peprotech, Neuilly sur Seine, France, 0.06 µM and 0.3 µM) for 21 days in osteoblast differentiation medium (basal medium supplemented with 100 nM dexamethasone, 50 µM ascorbic acid, 20 mM β-glycerophosphate). Cells treated with 0.3 µM of leptin, were incubated with or without specific inhibitors of Akt (A6730, 10 µM, Sigma-Aldrich) or ERK (PD184352, 1 µM, Sigma-Aldrich). After 21 days of treatment, cells were rinsed 3 times with PBS. To analyse alkaline phosphatase (ALP) activity, VICs were lysed with RIPA buffer supplemented with protease inhibitors (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). ALP assay (Abcam, Cambridge, MA, USA) was performed on treated VICs protein lysates according to the manufacturer's recommendations.

RNA was extracted from VICs after homogenization in TRIzol reagent (Life Technologies), following the Chomczynski and Sacchi protocol [14].

2.7 Quantitative RT-qPCR

Two micrograms of total extracted RNA were reverse transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies) in a total volume of 20 µl, according to manufacturer's procedures. Samples were incubated at 25 °C for 10 min, followed by 2 h at 37 °C. The obtained cDNA were stored at -20 °C. Real-time PCR was performed using an ABI PRISM 7000 Detection System (Life Technologies). Four microliters of reverse transcription product is added to 16 µl of a mix consisting of 10 µl of master mix containing Taq polymerase, MgCl₂, and dNTPs (Life Technologies), 1 µl solution containing sense and antisense primers and

TaqMan® probe specific for the gene of interest and 5 µl of water. The expressions of the transcripts were normalized by Abelson (ABL) mRNA expression, used as an endogenous reference gene (Ipsogen, Marseille, France). The relative quantification of the transcripts was performed using the cycle threshold (Ct) comparative method and calculated with the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. For each sample, detection of PCR products was performed separately and in duplicate.

The primers and the TaqMan fluorogenic probe (Life Technologies) for ObR-L and ObR-S had the sequences as previously described [15]. ALP, bone morphogenetic protein (BMP-2), osteopontin and runt-related transcription factor 2 (RUNX2) commercial assays were purchased from Life Technologies (Hs01029144_m1, Hs00154192_m1, Hs00959010_m1, Hs00231692_m1, respectively).

2.8 Statistical analysis

All data are reported as mean ± SEM for continuous variables and as absolute numbers and percentages of patients for categorical variables. A Student t-test for continuous variables and Pearson's chi-square test for dichotomous variables were used. Correlation between 2 continuous variables was evaluated by Pearson R square test. Wilcoxon test was used to analyse differences in paired samples. For all analysis, a p-value ≤0.05 was considered statistically significant. All statistical analysis were performed using SPSS version 20.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, Illinois).

3. Results

3.1 CAVD patients present higher serum free leptin concentrations

Characteristics of the patient populations are shown in Table 1. The CAVD patient group was composed of 24 males and 19 females aged between 46 and 84 years.

The CAD group consisted in 129 sex- and age-matched patients. CAVD patients had a higher BMI than CAD patients. The percentage of smokers was more important in the CAD group than in CAVD group. Concerning diabetes mellitus, dyslipidemia, arterial hypertension and medications, no difference was observed between the 2 groups. CAVD patients had significantly higher serum free leptin concentrations compared to CAD patients.

3.2 Leptin and its receptors levels are higher in calcified zones of stenotic aortic valves

Interestingly, free leptin levels in the valves were higher in homogenates of calcified vs non-calcified zones (Figure 1 A, 229 ± 38 vs 121 ± 20 pg/mg of protein, $p=0.01$). Moreover, leptin concentration in the aortic valves (both in non-calcified and calcified zones) was strongly and positively correlated with serum free leptin (Supplemental figure 1).

As the effects of leptin occur through its receptors ObR-L and ObR-S, we analysed expression of both receptors in homogenates of non-calcified and calcified valvular zones and revealed that calcified zones presented 11x more ObR-L relative expression than non-calcified zones (Figure 1 B, 0.69 ± 0.18 vs 0.06 ± 0.02 , $p<0.0001$). In contrast, no difference was observed in ObR-S expression between non-calcified and calcified zones. Immunohistological experiments confirmed the higher expression of leptin and its receptors in calcified areas of calcific aortic valves (Figure 1 C).

3.3 Leptin enhances the osteoblast phenotype of human VICs

As we observed that VICs expressed both the short and long isoforms of leptin receptors (data not shown), we tested whether leptin could enhance VICs osteoblast phenotype. Cells were cultured in osteoblast differentiation medium supplemented or

not with leptin (0.06 or 0.3 μ M) for 21 days. ALP activity was induced by 0.06 μ M and 0.3 μ M of leptin in a dose-dependent manner when compared to medium alone (Figure 2 A, $p=0.004$ for both). Moreover, leptin treatment modulated the expression of genes involved in osteoblast differentiation (Figure 2 B-E). After 21 days of VICs cultured in presence of 0.06 and 0.3 μ M of leptin, mRNA levels of ALP increased 3 and 4 fold, respectively ($p=0.001$ and 0.002), compared to VICs cultured without leptin. RUNX2 expression increased in a dose-dependent manner by 1.5 and 1.8 fold, in presence of 0.06 μ M and 0.3 μ M of leptin, respectively ($p=0.016$, for both) and BMP-2 expression increased 1.5 fold when cells were stimulated by 0.3 μ M of leptin ($p=0.004$). In addition, the expression of osteopontin, a negative regulator of calcification, decreased >40% in presence of 0.06 μ M and 0.3 μ M of leptin ($p=0.0005$ and $p=0.0034$, respectively).

3.4 Leptin-mediated osteoblast differentiation is dependent on Akt and ERK activation

Leptin-ObR axis is known to activate the PI3K/Akt and MAPK pathways. The potential role of these pathways in the induction of VICs calcification by leptin *in vitro* was assessed using specific inhibitors of Akt and ERK. The increase of ALP activity after treatment with 0.3 μ M of leptin was inhibited by both inhibitors (Figure 3 A, $p=0.015$ for both conditions). In line, induction of ALP and RUNX2 was Akt and ERK-dependent (Figure 3 B, C, respectively, $p=0.002$ and 0.003 for ALP expression and $p=0.031$ for both inhibitors for RUNX2 expression). BMP-2 expression in VICs in response to leptin was prevented by ERK inhibition only (Figure 3 D, $p=0.031$). On the other hand, inhibition of Akt or ERK prevented the decrease of osteopontin expression induced in VICs by leptin (Figure 3 E, $p=0.031$ for both inhibitors).

4. Discussion

To our knowledge, this is the first report showing a role of leptin in CAVD by promoting human VICs osteoblast differentiation in an Akt and ERK-dependent manner. Herein we report that serum free leptin is higher in CAVD patients without CAD compared to age- and sex- matched CAD patients without CAVD. This suggests that leptin could directly contribute to aortic valve degeneration, independently of cardiovascular confounding variables. Only 2 studies assessed the association between circulating leptin levels and CAVD. Glader *et al.* observed higher leptin levels in the plasma of 102 CAVD patients compared to age- and sex-matched healthy individuals [16]. However, the CAVD patients population presented a very high prevalence of concomitant cardiovascular diseases, especially severe CAD, observed in 66% of patients. Prior reports showed that these disorders are associated with increased leptin levels [8, 9, 17]. Kolasa-Trela *et al.*, on the other hand, studied CAVD patients without concomitant cardiovascular diseases and observed no difference in circulating leptin levels compared to controls (n=74 for each group) [18]. Interestingly, it is important to note that different methods are used to measure leptin levels. Glader *et al.* used a double antibody radio-immunoassay and Kolasa-Trela *et al.* applied a method based on the Bio-Rad Luminex system, both detecting total leptin (free and soluble receptor-bound leptin). In our study we used a human leptin ELISA kit, which only quantifies free leptin, the main biologically active form of leptin [19]. The difference observed in the present study for leptin levels between the 2 groups of patients (CAVD vs CAD) is associated with the higher BMI in CAVD patients. Different studies have shown that circulating leptin levels are increased in obese patients and positively correlate with BMI [20, 21]. Furthermore,

in several large population cohorts, obesity was independently associated with the incidence and progression of CAVD [22-24].

Recently, Ben-zvi et al. showed in a cohort of 11 all-comers CAVD patients that leptin is expressed in aortic valve leaflets [13]. The present report, based on a cohort of 43 CAVD patients without concomitant CAD confirms this presence and also reveals that leptin is higher in calcified zones of stenotic aortic valves. Interestingly, we also observed a strong correlation between serum free leptin levels and leptin concentration in the aortic valves suggesting that at least a part of the leptin present in the calcific aortic valves comes from the bloodstream [25]. Moreover, our results underline for the first time the expression of leptin receptors, both short and long isoforms, in human calcific aortic valves. ObR-L is also known to be expressed in a variety of human peripheral tissues, such as normal artery wall and atherosclerosis lesions [26, 27]. Our results also demonstrate higher concentrations of ObR-L in valvular calcified zones, consistently with its role observed in calcified coronary artery disease [11, 27].

In 2009, Zeadin *et al* showed that chronic leptin treatment enhanced calcification in the aortic valve of ApoE^{-/-} mice and the expression of calcification related genes [11] and Ben-zvi et al. underlined that leptin promoted human VICs mineralization in procalcifying medium [13]. The present study reveals that leptin stimulation increases the osteoblast differentiation of VICs isolated from CAV patients and brings to light the signalling pathways *via* which leptin exerts its effects on human VICs.

VICs stimulation with leptin induced the expression of markers of osteoblast differentiation such as ALP, BMP-2 and RUNX2 in a dose-dependent manner. A previous study showed that BMP-2 is present in the stenotic aortic valves, mostly in cell-rich areas associated with focal calcium deposits, but not in healthy valves [28,

29]. It is also reported that leptin enhances the osteoinductive activity of BMP-2 in mice [30]. Moreover, it's well described that RUNX2 is the master transcription factor for osteoblast differentiation [31] and that ALP mediates the differentiation process and provides phosphate ions for calcium phosphate mineral formation [32]. Finally, we observed a decreased expression of osteopontin in human VICs stimulated by leptin. Osteopontin is known to have antinomic effects on calcification processes by its ability to bind hydroxyapatite with high affinity, but it is also a potent inhibitor of vascular calcification [33, 34].

To gain further insight into the mechanisms by which leptin and VICs calcification are related, we evaluated signalling events in VICs following leptin treatment. Thus, in the present report, we observed that leptin stimulation modulated ALP activity, RUNX2 and osteopontin mRNA expression in an Akt and ERK dependent manner. Akt and ERK are 2 pathways well known to play critical roles in osteoblast-differentiation of VICs and valvular calcification [35, 36]. Moreover, it is now well established that the long isoform ObR-L, mainly expressed in VICs as observed in the present study, is responsible for signal transduction through the activation of Akt and ERK signaling pathways in VSMC [37, 38].

Some potential limitations of this study should be mentioned. First, all included CAVD patients present the severe form of the disease, with heavily calcified leaflets.

Therefore, our findings might not be representative of the earlier processes of CAVD. Second, the leptin concentrations used *in vitro*, selected on basis of previous studies on leptin and its effects on vascular cell calcification, may differ from the concentrations within the valvular tissue. [12, 27]

In conclusion, our study demonstrates that CAVD patients have higher serum levels of free leptin compared to CAD patients. We highlight the presence of leptin and its

receptors in calcified zone of stenotic aortic valves and the expression of leptin receptors by human VICs. Finally, our results show that leptin increases osteoblast differentiation of human VICs in an Akt and ERK dependent manner. Thus, this study provides new insights into the pathogenesis of CAVD and suggests that reducing circulating leptin levels or blocking leptin actions on VICs could be promising therapeutic strategies for CAVD.

Acknowledgements

We are grateful to Bertrand Vaast and Alexandre Ung for their excellent technical assistance. Bart Staels is a member of the Institut Universitaire de France.

References

- [1] Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, 3rd, Guyton RA, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:e57-185.
- [2] Yetkin E, Waltenberger J. Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. *Int J Cardiol.* 2009;135:4-13.
- [3] Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Iung B, Lancellotti P, Otto CM, et al. Calcific aortic stenosis. *Nature reviews Disease primers.* 2016;2:16006.
- [4] Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:113-8.
- [5] Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol.* 2007;171:1407-18.
- [6] Cloyd KL, El-Hamamsy I, Boonrungsiman S, Hedegaard M, Gentleman E, Sarathchandra P, et al. Characterization of Porcine Aortic Valvular Interstitial Cell 'Calcified' Nodules. *PLoS ONE.* 2012;7.
- [7] Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet.* 1998;351:737-42.
- [8] Elkalioubie A, Zawadzki C, Roma-Lavisse C, Chinetti-Gbaguidi G, Tagzirt M, Corseaux D, et al. Free leptin, carotid plaque phenotype and relevance to related symptomatology: insights from the OPAL-Lille carotid endarterectomy study. *Int J Cardiol.* 2013;168:4879-81.
- [9] Payne GA, Kohr MC, Tune JD. Epicardial perivascular adipose tissue as a therapeutic target in obesity-related coronary artery disease. *Br J Pharmacol.* 2012;165:659-69.
- [10] Singh M, Bedi US, Singh PP, Arora R, Khosla S. Leptin and the clinical cardiovascular risk. *Int J Cardiol.* 2010;140:266-71.
- [11] Zeadin M, Butcher M, Werstuck G, Khan M, Yee CK, Shaughnessy SG. Effect of Leptin on Vascular Calcification in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:2069-75.
- [12] Zeadin MG, Butcher MK, Shaughnessy SG, Werstuck GH. Leptin promotes osteoblast differentiation and mineralization of primary cultures of vascular smooth muscle cells by inhibiting glycogen synthase kinase (GSK)-3 β . *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;425:924-30.

- [13] Ben-Zvi D, Savion N, Kolodgie F, Simon A, Fisch S, Schafer K, et al. Local Application of Leptin Antagonist Attenuates Angiotensin II-Induced Ascending Aortic Aneurysm and Cardiac Remodeling. *J Am Heart Assoc.* 2016;5.
- [14] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-9.
- [15] Revillion F, Charlier M, Lhotellier V, Hornez L, Giard S, Baranzelli MC, et al. Messenger RNA expression of leptin and leptin receptors and their prognostic value in 322 human primary breast cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2006;12:2088-94.
- [16] Glader CA, Birgander LS, Söderberg S, Ildgruben HP, Saikku P, Waldenström A, et al. Lipoprotein(a), Chlamydia pneumoniae, leptin and tissue plasminogen activator as risk markers for valvular aortic stenosis. *European Heart Journal.* 2003;24:198-208.
- [17] Shanker J, Rao VS, Ravindran V, Dhanalakshmi B, Hebbagodi S, Kakkar V. Relationship of adiponectin and leptin to coronary artery disease, classical cardiovascular risk factors and atherothrombotic biomarkers in the IARS cohort. *Thrombosis and Haemostasis.* 2012;108:769-80.
- [18] Kolasa-Trela R, Miszalski-Jamka T, Grudzień G, Wypasek E, Kostkiewicz M. Adiponectin, leptin, and resistin in patients with aortic stenosis without concomitant atherosclerotic vascular disease. *Pol Arch Med Wewn.* 2011;121:352-9.
- [19] Shapiro NI, Khankin EV, Van Meurs M, Shih SC, Lu S, Yano M, et al. Leptin exacerbates sepsis-mediated morbidity and mortality. *Journal of immunology.* 2010;185:517-24.
- [20] Lisko I, Tiainen K, Stenholm S, Luukkaala T, Hurme M, Lehtimäki T, et al. Are body mass index, waist circumference and waist-to-hip ratio associated with leptin in 90-year-old people? *Eur J Clin Nutr.* 2013;67:420-2.
- [21] Muc M, Todo-Bom A, Mota-Pinto A, Vale-Pereira S, Loureiro C. Leptin and resistin in overweight patients with and without asthma. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2014;42:415-21.
- [22] Eveborn GW, Schirmer H, Lunde P, Heggelund G, Hansen J-B, Rasmussen K. Assessment of risk factors for developing incident aortic stenosis: the Tromsø Study. *Eur J Epidemiol.* 2014;29:567-75.
- [23] Ngo MV, Gottdiener JS, Fletcher RD, Fericola DJ, Gersh BJ. Smoking and obesity are associated with the progression of aortic stenosis. *Am J Geriatr Cardiol.* 2001;10:86-90.
- [24] Katz R, Budoff MJ, Takasu J, Shavelle DM, Bertoni A, Blumenthal RS, et al. Relationship of metabolic syndrome with incident aortic valve calcium and aortic valve calcium progression: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes.* 2009;58:813-9.

- [25] Michel JB, Thauinat O, Houard X, Meilhac O, Caligiuri G, Nicoletti A. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1259-68.
- [26] Schroeter MR, Schneiderman J, Schumann B, Glückermann R, Grimmas P, Buchwald AB, et al. Expression of the leptin receptor in different types of vascular lesions. *Histochem Cell Biol.* 2007;128:323-33.
- [27] Parhami F, Tintut Y, Ballard A, Fogelman AM, Demer LL. Leptin Enhances the Calcification of Vascular Cells Artery Wall as a Target of Leptin. *Circ Res.* 2001;88:954-60.
- [28] Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Vahl CF, Hagl S, Brueckmann M, et al. Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis. *J Heart Valve Dis.* 2004;13:560-6.
- [29] Gomez-Stallons MV, Wirrig-Schwendeman EE, Hassel KR, Conway SJ, Yutzey KE. Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Required for Aortic Valve Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36:1398-405.
- [30] Xu J-C, Wu G-H, Liu H-L, Liu J-T, Yan X-J, Chen J-T. The effect of leptin on the osteoinductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in nude mice. *Saudi Med J.* 2010;31:615-21.
- [31] Rusanescu G, Weissleder R, Aikawa E. Notch signaling in cardiovascular disease and calcification. *Curr Cardiol Rev.* 2008;4:148-56.
- [32] Bobryshev YV, Orekhov AN, Sobenin I, Chistiakov DA. Role of bone-type tissue-nonspecific alkaline phosphatase and PHOSPO1 in vascular calcification. *Current Pharmaceutical Design.* 2014;20:5821-8.
- [33] 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;11:206-13.
- [34] Speer MY, Chien Y-C, Quan M, Yang H-Y, Vali H, McKee MD, et al. Smooth muscle cells deficient in osteopontin have enhanced susceptibility to calcification in vitro. *Cardiovascular Research.* 2005;66:324-33.
- [35] Yuan ZS, Zhou YZ, Liao XB, Luo JW, Shen KJ, Hu YR, et al. Apelin attenuates the osteoblastic differentiation of aortic valve interstitial cells via the ERK and PI3-K/Akt pathways. *Amino Acids.* 2015:1-8.
- [36] Choi YH, Kim Y-J, Jeong HM, Jin Y-H, Yeo C-Y, Lee KY. Akt enhances Runx2 protein stability by regulating Smurf2 function during osteoblast differentiation. *FEBS J.* 2014;281:3656-66.

[37] Liu G-Y, Liang Q-H, Cui R-R, Liu Y, Wu S-S, Shan P-F, et al. Leptin Promotes the Osteoblastic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells From Female Mice by Increasing RANKL Expression. *Endocrinology*. 2013;155:558-67.

[38] Chavez RJ, Haney RM, Cuadra RH, Ganguly R, Adapala RK, Thodeti CK, et al. Upregulation of thrombospondin-1 expression by leptin in vascular smooth muscle cells via JAK2- and MAPK-dependent pathways. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2012;303:C179-91.

Tables

Table 1: Clinical and biological characteristics of CAVD and CAD patients

Characteristics	CAVD n=43	CAD n=129	p [§]
Age	70.14 (1.51)	70.20 (0.84)	Matched
Male sex	24 (56%)	72 (56%)	Matched
Body mass index	29.3 (1.1)	27 (0.3)	0.009
Smoking	3 (7%)	58 (45%)	<0.001
Diabetes mellitus	14 (33%)	41 (32%)	0.852
Dyslipidemia	26 (60%)	94 (73%)	0.125
Arterial hypertension	33 (77%)	80 (62%)	0.114
Statins	26 (60%)	72 (56%)	0.391
ARA/ACE inhibitors	25 (58%)	79 (61%)	0.976
β-blockers	23 (53%)	87 (67%)	0.136
Hypoglycaemic medication	13 (30%)	41 (32%)	0.850
Calcium channel blockers	12 (28%)	31 (24%)	0.502
Serum free leptin (ng/ml)	27.7 (4.7)	15.7 (1.5)	0.002

Data are expressed as mean (\pm SEM) or as number (percentage).

CAVD: Calcific Aortic Valve Disease, CAD: Coronary artery disease, ARA/ACE

inhibitors: Angiotensin II receptor antagonist/angiotensin-converting-enzyme inhibitor,

§: CAVD compared to CAD

Figure legends

Figure 1: Expression of leptin and its receptors is increased in calcified zones

of stenotic aortic valves. (A) Leptin levels in non-calcified and calcified valvular zones (n=43). (B) Leptin receptors (ObR-S and ObR-L) relative mRNA expression in non-calcified and calcified zones of aortic valves (n=43) *: p < 0.05.

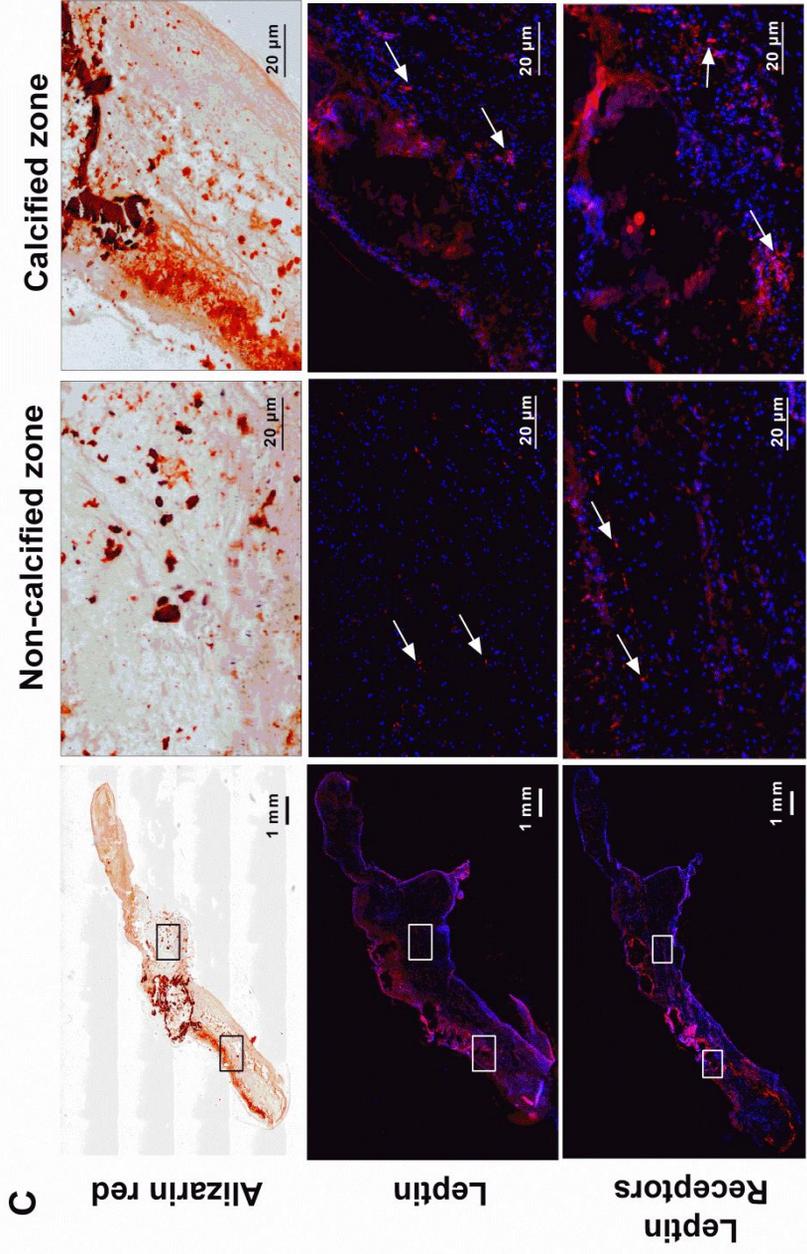
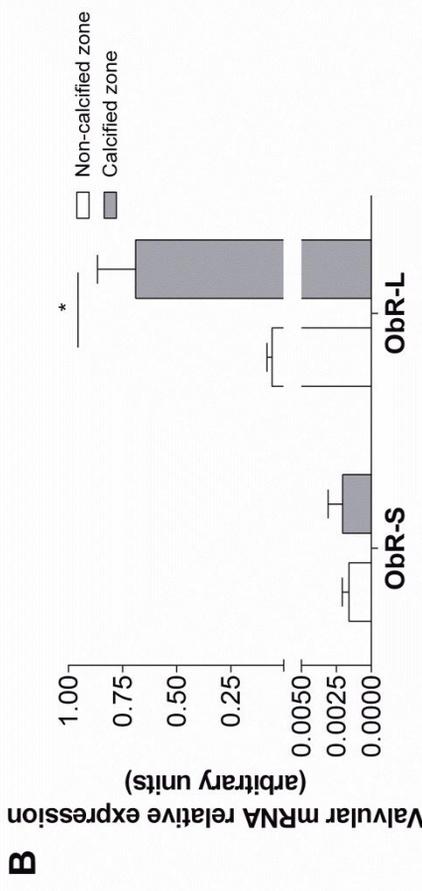
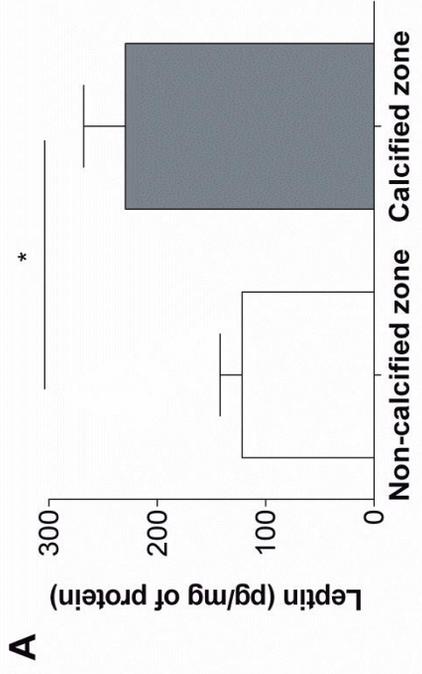
(C) Representative images of Alizarin red staining for ionized calcium content and of leptin and leptin receptors (arrowheads) in human aortic valves (n=5).

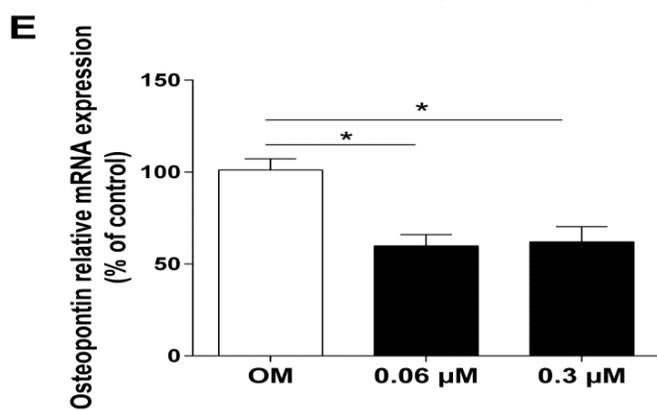
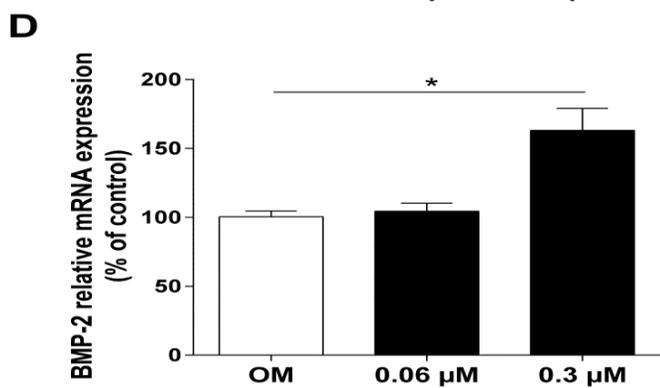
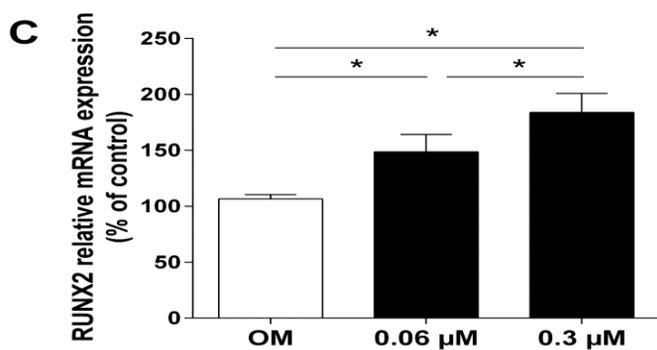
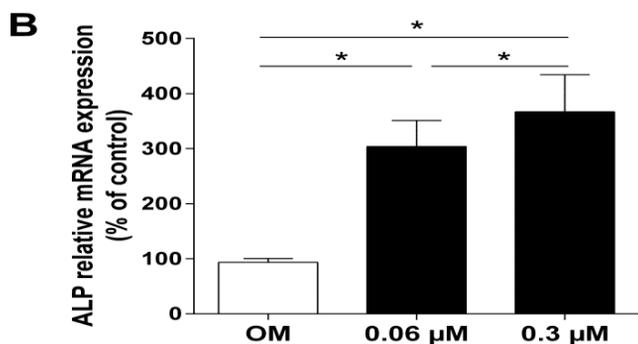
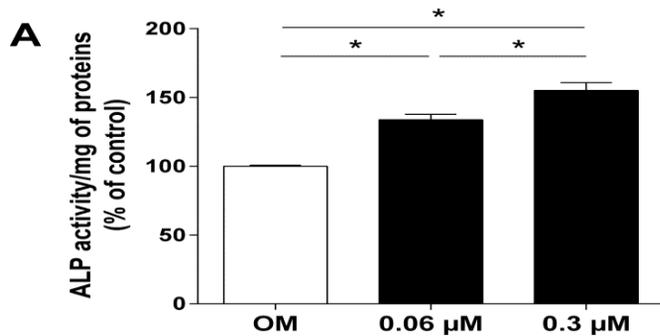
Figure 2: Leptin modulates osteoblast differentiation in VICs.

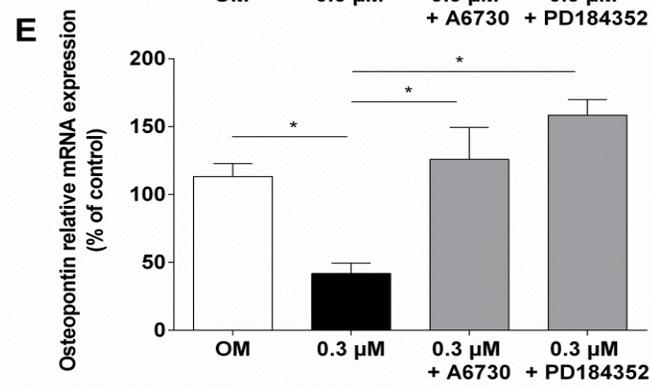
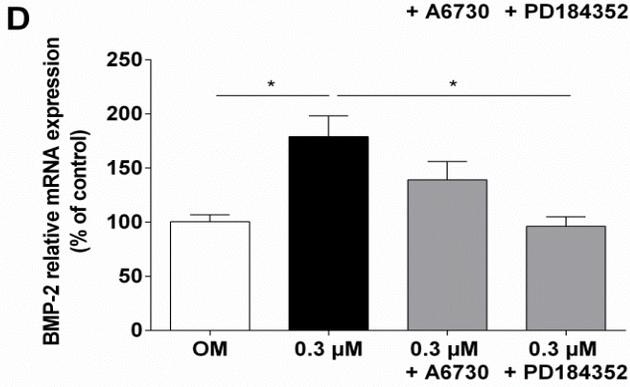
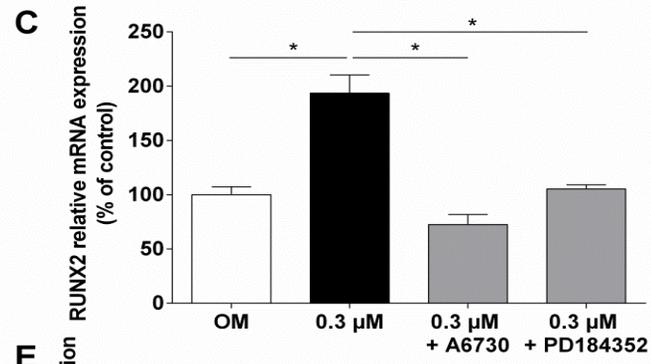
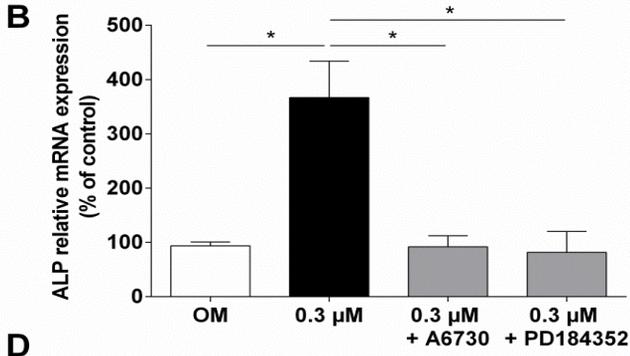
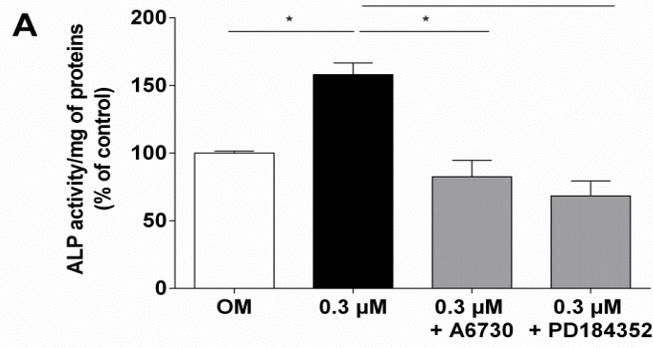
(A) ALP activity of VICs cultured in presence or not of leptin (0.06 or 0.3 μ M for 21 days) (n=5). (B-E) mRNA expression of osteoblast differentiation related genes in VICs cultured in presence or not of leptin (0.06 or 0.3 μ M for 21 days) (n=5). *:p < 0.05

Figure 3: Leptin-mediated osteoblast differentiation is dependent on Akt and

ERK activation. (A) ALP activity of VICs cultured in presence of leptin 0.3 μ M with or without Akt or ERK inhibitor (n=5). (B-E) mRNA expression of osteoblast differentiation related genes in VICs cultured in presence of leptin 0.3 μ M with or without Akt or ERK inhibitor (n=5). *:p < 0.05







Human alternative M2 macrophages populate calcified areas of atherosclerotic lesions and display impaired RANKL-induced osteoclastic bone resorption activity

Daoudi M.^{1*}, Rosa M.^{1*}, Louvet L.², Copin C.¹, Fanchon M.¹, Vanhoutte J.¹, Derudas B.¹, Belloy L.¹, Eeckhoutte J.¹, Haulon S.³, Zawadzki C.¹, Susen S.¹, Massy Z. A.^{2,4}, Staels B.¹, Chinetti-Gbaguidi G.^{1,5}

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

² Inserm U1088, University of Picardie Jules Verne, and Amiens University Hospital, Amiens, France

³ CHU Lille, F-59000 Lille, France

⁴ Division of Nephrology, Ambroise Paré University Hospital, AP-HP, Paris-Ile-de-France-Ouest University (UVSQ), Boulogne-Billancourt, France

⁵ University of Côte d'Azur, CHU, Inserm, CNRS, IRCAN, France.

*: These authors equally contributed to the work

Short title: Alternative M2 macrophages in vascular calcification

Total word count : 8000 maxi; actuellement: 7393

Subject codes: [134], [97], [142]

Corresponding author:

Pr. Bart Staels

Inserm UMR1011

Institut Pasteur de Lille

1, rue du Professeur Calmette

BP245, 59019 Lille

France

Tel +33.3.20 87 73 88

Fax +33.3.20 87 73 60

bart.staels@pasteur-lille.fr

Abstract

Rationale - Vascular calcification is a process similar to bone formation leading to an inappropriate deposition of calcium phosphate minerals in advanced atherosclerotic plaques. Monocyte-derived macrophages, located in the atherosclerotic lesions, present heterogeneous phenotypes going from classical pro-inflammatory M1 to alternative anti-inflammatory M2 macrophages and can act as osteoclast progenitors.

Objective – To characterize the phenotype of macrophages located in areas surrounding the calcium deposits in human atherosclerotic plaques.

Methods and Results - Macrophages near the calcium deposits display an alternative phenotype being positive for both CD68 and mannose receptor (MR) expression (CD68⁺MR⁺). *In vitro*, IL-4-polarized human primary M2 macrophages are characterized by lower expression and activity of cathepsin K (CTSK) compared to unpolarized resting macrophages (RM). Furthermore, despite higher RANK expression, the RANKL/MCSF-induced signaling pathways and osteoclast activation are defective in M2 macrophages leading to reduced bone resorption. This is associated with higher expression of the osteoclast inhibitors B cell lymphoma 6 (Bcl6) and Interferon Regulatory Factor 8 (IRF8) and lower expression of the osteoclast transcriptional activator B-lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp1) in M2 macrophages compared to RM. Moreover, inhibition of Blimp1 expression in RM decreased CTSK expression to levels found in M2 macrophages.

Conclusions - These results indicate that macrophages surrounding calcium deposits in human atherosclerotic plaques are phenotypically unable to resorb calcification.

Keywords: macrophage phenotype, vascular calcification, atherosclerosis

Introduction

Vascular calcification (VC), an inappropriate deposition of calcium phosphate mineral, can occur in nearly all arterial beds and in both the intimal and medial layers. Intimal calcification is associated with inflammation and the development of plaques and occlusive lesions, while adjacent regions of the vessel wall may remain remarkably normal. This intimal form of calcification is an indicator of an advanced stage of atherosclerosis and is seen in the aorta, coronary arteries, and other large arteries^{1,2}. VC reduces aortic and arterial elasticity, thus impairing cardiovascular hemodynamics³ contributing to hypertension, aortic stenosis and cardiac hypertrophy^{4,6}. VC is an independent risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. Furthermore, VC is tightly associated with aging and arterial remodelling, including intima-media thickening but also changes of the geometry and function of aortic valves (decreased aortic valve surface area and smaller valve opening).

VC is now recognized as a dynamic regulated process sharing many features with bone formation. A current hypothesis relies on the balance between potential osteoblast-like and osteoclast-like activities, the latter preventing calcium phosphate deposition in the vasculature^{7,8}. Bone is a specialized connective tissue consisting of cells and mineralized extracellular matrix. Organic and inorganic components of the matrix are mainly formed by collagen I fibers and spindle- or plate-shaped crystals of hydroxyapatite, respectively. Bone tissue contains osteoblastic bone forming cells and osteoclastic bone resorbing cells. Osteoblasts (OTBs) originating from local mesenchymal stem cells are responsible for the production of the calcified matrix⁹. Osteoclasts (OTCs) are large multinucleated cells originating from monocyte/macrophage lineage precursors¹⁰. OTBs hydrolyze both ATP and inorganic pyrophosphate (PPi), providing phosphate to promote mineralization¹¹. Development of mature osteoclasts is closely co-regulated by Macrophage Colony-Stimulating Factor (MCSF) and Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Ligand (RANKL), which are mainly produced by osteoblastic stromal cells in bone¹² and by vascular smooth muscle cells (SMC) under specific conditions in the arterial wall¹³. RANKL is either a membrane-bound protein or can be shedded upon cleavage by osteoclast-derived matrix metalloproteinase (MMP)^{7,14}. RANKL is a trans-membrane ligand on the surface of OTBs that binds to its receptor RANK present on the membranes of macrophage precursors driving OTC differentiation by increasing tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) expression¹⁵.

The key event in bone resorption is the adhesion of osteoclasts to the bone extracellular matrix. Indeed, mature osteoclasts migrate to different bone regions and attach to the bone surface through interaction of integrin α V/ β 3 heterodimers with bone matrix proteins such as osteopontin (OPN) or vitronectin (reviewed in¹⁶). Osteoclastic bone resorption initially involves mineral dissolution, followed by a degradation of the organic phase. Bone demineralization involves acidification of the extracellular microenvironment, mediated by an H⁺-ATPase in the cell's ruffled membrane that pumps H⁺ ions into the resorption pit. Carbonic anhydrase type II (CA2) that catalyzes the production of H⁺ from carbon dioxide and water and sodium-bicarbonate co-transporter (NBCn1) are required in this process¹⁷. H⁺ are released via H⁺-ATPase pumps to create an acidic environment. The acidic milieu both dissolves the mineral constituents of bone and provides an optimal environment for organic matrix degradation mainly by the lysosomal protease Cathepsin K (CatK)^{18,19}, MMP-9 and heparanase-1 (HSPE-1)²⁰. Moreover, osteoclasts derived from CTSK-deficient mice display an impaired bone resorption activity, supporting the notion that CTSK is of major importance in bone remodelling²¹.

The presence of both monocyte-macrophages that are able to differentiate directly into osteoclasts, and SMC that have an osteoblast-like phenotype and secrete factors involved in osteoclast differentiation (such as RANKL, MCSF or pro-inflammatory cytokines) in the calcified vascular wall, strongly suggest the existence of a possible osteoclastogenesis in the arterial beds^{7,22}. Indeed, TRAP positive multinucleated giant OTC-like cells have been detected in human atherosclerotic lesions²³. Moreover, co-localization of CA2 staining with the macrophage marker CD68 has been reported in human atherosclerotic plaques²⁴. In addition, CTSK expression and activity within the atherosclerotic lesions are mainly detected in macrophages²⁵. Furthermore, CTSK expression is increased in advanced plaques leading to excessive proteolytic tissue-remodelling thus contributing to plaque rupture²⁶. However, the presence of osteoclast-like cells in the vascular wall is rather limited, possibly due to factors that inhibit/modulate the differentiation of monocyte/macrophages into osteoclast-like cells²⁷. Indeed, monocyte-derived macrophages present different functional

phenotypes depending on their micro-environment²⁸. While Th1 cytokines, such as IFN γ , or LPS lead to a “classical” M1 activation phenotype, Th2 cytokines, such as interleukin (IL)-4 or IL-13, induce an “alternative” M2 activation program characterized by the high expression of mannose receptor (MR). Moreover, *in vivo*, several macrophage subpopulations have been identified in human atherosclerotic plaques²⁹. We previously reported the presence of CD68⁺MR⁺ alternative macrophages in human atherosclerotic plaques³⁰ in areas surrounding the lipid-rich area³¹ or in iron-rich neo-vascularized zones³².

Since previous studies reported the presence of CD68⁺ macrophages in zones surrounding the calcified areas of human atherosclerotic plaques³³, the objective of this study was to characterize the functional phenotype of these macrophages.

Methods

Immunohistology and laser-capture microdissection (LCM)

Human atherosclerotic plaques were collected during carotid endarterectomy procedures at the University Hospital of Lille (France) after the approval of the local ethics committee. Informed consent was obtained from all patients. Samples were snap-frozen in liquid nitrogen directly after the surgery. For immunohistochemical staining, endogenous peroxidase activity was quenched. SMC were identified with anti- α -actin and macrophages with anti-CD68 antibodies (Dako), using N-Histofine Simple Stain (Nichirei Biosciences Inc.). α -actin was revealed as a grey precipitate (Vector SG) and CD68 by red staining (Vector Nova Red). Adjacent sections were stained with goat polyclonal anti-human MR (Santacruz biotechnology), rabbit anti-CA2 (Abcam) or mouse monoclonal anti-RANK (LSBio) antibodies. Alizarin red S (Sigma-Aldrich, France) staining was performed to detect calcium deposits. Sections of atherosclerotic plaques containing CD68⁺MR⁺ or CD68⁺MR⁻ macrophages were submitted to laser capture microdissection (LCM) (ArcturusXT MDS Analytical Technologies)³¹ and macrophage-enriched areas were captured from 4 adjacent 8 μ m-sections and pooled for RNA extraction.

Cell Culture

Human peripheral blood mononuclear cells were isolated from healthy donors by Ficoll density gradient centrifugation. Resting macrophages (RM) were obtained from adherent monocytes cultured for 6 days in RPMI 1640 medium (Gibco, Invitrogen) supplemented with gentamicin (40 μ g/mL), l-glutamine (2 mmol/L) (Sigma-Aldrich) and 10% pooled human serum (Abcys). To yield M2-polarized macrophages, recombinant human IL-4 (15 ng/mL, Promocell) was added at the beginning of differentiation³¹. In some experiments, monocytes were differentiated during 6 days in α MEM medium (Gibco, Invitrogen) containing IL-4 (M2) or not (RM), in the absence or in the presence of RANKL/MCSF (50 ng/ml and 30 ng/ml respectively, R&D Systems) to promote osteoclastogenesis. Culture medium was changed every 3 days. For bone resorption experiments, monocytes were differentiated in α MEM medium (Gibco, Invitrogen) with RANKL/MCSF (25 ng/ml and 30 ng/ml respectively) in the absence or in the presence of IL-4 during 14 days. Culture medium was changed twice a week.

siRNA-mediated RNA interference

Smart-pool siRNA oligonucleotides corresponding to human Blimp1 (Dharmacon Thermo Scientific) and scrambled control RNA (Ambion) were used. After six days of differentiation in the presence of RANKL/MCSF, RM macrophages were transfected using Dharmafect4 reagent (Dharmacon Thermo Scientific) in serum-free α MEM medium for 16 hours. Transfection medium was then replaced with fresh serum-free α MEM medium and the incubation continued for 24 hours before RNA extraction.

RNA extraction and analysis

RNA from macrophages and osteoclasts was extracted using Trizol (Life Technologies, France) and RNeasy kits (Qiagen), respectively. RNA extraction from LCM-isolated samples was performed using the Picopure RNA extraction kit (MDS Analytical Technologies). RNA quality was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). Only samples displaying a RNA Integrity Number (RIN) ≥ 6 were used for further analyses. RNA was amplified in two rounds using the ExpressArt TRinucleotide mRNA amplification Nano kit (AmpTec GmbH). For quantitative PCR (q-PCR), RNA was reverse transcribed using random hexamer primers and Superscript reverse transcriptase (Life Technologies, France). Reverse transcribed cDNAs were quantified by Brilliant III Ultra-Fast SYBR green based q-PCR using specific oligonucleotides (Supplemental Table 1) on an Mx3000 apparatus (Stratagene, La Jolla, CA). mRNA levels were normalized to TFIIB and cyclophilin as internal control for *in vitro* and *ex vivo* experiments, respectively.

Protein extraction and western blot analysis

Cells were lysed in phosphate saline buffer containing Triton X100 1%, sodium deoxycholate 5 mg/ml (Sigma-Aldrich) supplemented with 2 mmol/L sodium orthovanadate, 100 mmol/L sodium fluoride, 10 mmol/L sodium diphosphate (Sigma-Aldrich) and protease inhibitor cocktail (Roche

Diagnostics, France). Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, France). After incubation for 1 hour in 5% non-fat dried milk (Dutscher, Brumath, France), membranes were incubated overnight with either rabbit polyclonal CA2 (Abcam), mouse monoclonal CTSK (Santacruz biotechnology) or polyclonal anti- β -actin (Santacruz biotechnology) antibodies. After washes with Tris 100 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, Tween 0.1%, membranes were incubated with donkey anti-rabbit antibody conjugated with horseradish peroxidase (1/5000, GE Healthcare) for 1 hour at room temperature (RT). Immunoreactive bands were detected with an enhanced chemiluminescence Western blotting detection reagent (ECL plus, GE Healthcare) and quantified by densitometry using the Image J software.

Flow cytometry

Cells were washed with PBS containing 0.1% BSA and 2 mmol/L EDTA during 30 min at room temperature (RT) followed by scraping of the adherent cells. Then, cells were incubated for 1 hour at RT in blocking buffer (PBS containing 0.1% BSA and non-specific goat IgG at 1 μ g/ml) and consecutively incubated with antibodies in autoMACS running buffer (Miltenyi Biotec, SAS) containing 0.1% BSA for 45min at 4°C. Polyclonal primary rabbit anti-CA2 (Abcam) or mouse anti-RANK (Abcam) antibodies were used followed by incubation with phycoerythrin (PE)-labeled goat anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies. To measure MR protein, a mouse anti-MR antibody coupled with APC (BD Pharmingen) was used. As negative control, cells were incubated without primary antibody. Cells were analyzed using FACScalibur™ (BD Biosciences). Data were processed using the FlowJo xV software.

ChIP-seq analysis

Chromatin immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing (ChIP-seq) was performed to monitor H3K9ac levels in both RM and M2 macrophages from 2 independent donors using an antibody against H3K9ac (17-658 from Millipore)³⁴. ChIP-seq signals were normalized to the total number of tags before visualization using the Integrated Genome Browser (IGB) (PMID 19654113) using a similar scale for RM and M2 macrophages from a given donor.

CTSK activity measurement

CTSK activity was measured in cellular extracts from RM and M2 macrophages using a fluorescence-based assay (Abcam) following the manufacturer's instructions.

Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) osteoclast staining and bone resorption activity measurement

Monocytes were differentiated into osteoclasts by growth on cortical bone slices obtained from bovine femora³⁵, in the absence or in the presence of RANKL/MCSF, with or without IL-4. Mature osteoclasts were stained for TRAP expression using a commercially available kit (leukocyte acid phosphatase staining kit, Sigma). Multinucleated (> 3 nuclei) TRAP-positive cells were counted as osteoclasts under microscopic examination with a Leica DM 2500 (Leica) coupled to a CCD video system (Sony). Pictures were acquired with Bonoscan (Microvision Instruments). To evaluate bone resorption activity, resorption lacunae (pits) were visualized by staining bone slices with haematoxylin red and a toluidine blue solution containing 1% sodium borate after osteoclast removal. The percentage of resorbed bone surface areas was quantified using Bonoscan (Microvision Instruments).

Statistical analysis

Statistical significance was analyzed by ANOVA and Student t-test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Macrophages located around calcified areas of human atherosclerotic lesions are CD68⁺MR⁺ alternative macrophages.

Given the existence of different macrophage sub-populations in human atherosclerotic lesions^{30,32,36}, as well as the presence of macrophages in areas surrounding the calcium deposits³³, we characterized the phenotype of the macrophages resident near the calcified areas. These CD68⁺ macrophages located in the proximity of calcium depots, positively stained by alizarin red (Figure 1), abundantly express the alternative macrophage marker MR (Figure 1), indicating that macrophages around calcium deposits likely differ from the classical inflammatory M1 macrophages.

In vitro polarized alternative M2 macrophages display an altered expression profile of osteoclast markers.

Since the CD68⁺MR⁺ macrophages locate *in vivo* in the proximity of calcium deposits, the osteoclastic profile of *in vitro* IL-4-polarized monocyte-derived M2 macrophages was analyzed. Strikingly, M2 macrophages, which display higher MR expression levels compared to RM macrophages (Figure 2A)³⁰, also present higher mRNA levels of the osteoclast marker CA2 (Figure 2B) but, interestingly, reduced gene expression levels of CTSK (Figure 2C) when compared to RM macrophages. CHIP-seq analysis of the histone H3 lysine 9 acetylation (H3K9ac, a marker of active promoters)³⁷ showed lower H3K9ac levels at the *CTSK* promoter and higher levels at the *CA2* promoter in M2 compared to RM macrophages, strongly suggesting that the observed lower *CTSK* mRNA levels are linked to reduced gene transcription (Supplemental Figure 1). Furthermore, *CTSK* protein expression was significantly lower in M2 macrophages compared to RM macrophages (Figure 2C), accompanied by a concomitant decreased of *CTSK* enzyme activity (Figure 2D). Moreover, mRNA levels of clusterin (*CLU*), a specific stabilizer of extra-cellular *CTSK*, were significantly lower in M2 macrophages compared to RM (Supplemental Figure 3A). Interestingly, similar as *in vitro* differentiated M2 macrophages, gene expression of *CTSK* was lower in CD68⁺MR⁺ macrophage-enriched areas compared to CD68⁺MR⁻ macrophage areas (Supplemental Figure 2). By contrast, *CA2* protein expression measured by flow cytometry and western blot analysis (Supplemental Figure 3A) as well as expression of *NBCn1*, necessary for *CA2* activity (Supplemental Figure 3B), was higher in M2 compared to RM macrophages. *In vivo*, *CA2* positive staining colocalized with MR⁺ macrophages in atherosclerotic plaques (Supplemental Figure 3B). Finally, expression of other genes involved in the structure ad degradation of extra-cellular matrix, such as *MMP-9*, *HSPE-1* and osteopontin (*OPN*), was lower in M2 macrophages compared to RM macrophages (Supplemental Figure 3C, 3D and 3E). Additionally, the mRNA expression of *NFATc-1*, an essential transcription factor regulating osteoclastogenesis³⁸, was lower in M2 compared to RM macrophages (Figure 2F), while those of *NFATc-2* was higher in M2 macrophages (Figure 2G). *NFATc-2* transactivates the promoter of the Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (*TRAP*), also called acid phosphatase 5 (*ACP5*)³⁹, a glycosylated monomeric metalloenzyme usually analyzed as an osteoclast marker⁴⁰. In line, *TRAP* mRNA levels were higher in M2 macrophages compared to RM macrophages (Figure 2H). Taken together, these data suggest that IL-4-polarized M2 macrophages display a particular osteoclastic phenotype mainly characterized by a lower expression and activity of *CTSK*.

IL-4 polarized M2 macrophages exhibit higher expression of RANK.

Since osteoclast differentiation occurs via the activation of the *RANKL/RANK* signaling pathway, the expression of *RANK* was measured. IL-4-polarized M2 macrophages express higher levels of *RANK* mRNA and membrane protein compared to RM macrophages (Figure 3A and 3B) which corresponds to a significant increase of the number of MR⁺*RANK*⁺ cells as determined by flow cytometry analysis (Figure 3C). *In vivo*, in human atherosclerotic plaques, *RANK* was also expressed in areas enriched in MR⁺ positive cells, as demonstrated by immunohistology (Figure 3D). Moreover, *RANK* mRNA levels were significantly higher in CD68⁺MR⁺ macrophages around calcified areas isolated by LCM, compared to CD68⁺MR⁻ macrophages (Figure 3E).

RANKL/MCSF-induced osteoclast activity is impaired in M2 macrophages.

Since IL-4 polarized M2 macrophages express higher RANK than RM macrophages, the cellular response to RANKL/MCSF activation allowing osteoclast maturation was investigated. Therefore, human monocytes were differentiated during 6 days in α MEM medium supplemented or not with RANKL/MCSF, in the absence or in the presence of IL-4. As expected, RANK mRNA levels were again higher in M2 compared to RM macrophages (Figure 4A). However, RANKL/MCSF activation slightly induced RANK mRNA in RM, but inhibited its expression in M2 macrophages (Figure 4A). Furthermore, RANKL/MCSF activation significantly increased gene expression of CA2, TRAP, NFATc-1, NFATc-2 and OPN in RM, but not in M2 macrophages (Figure 4B-F). In line, RANKL/MCSF induced CTSK gene expression (Figure 4G) and activity (Figure 4H) in RM (as already described⁴¹), but not in M2 macrophages. These data indicate that despite the higher expression of RANK, M2 macrophages are globally less responsive to RANKL/MCSF activation than RM macrophages.

To evaluate the functional consequences of the reduced response of M2 macrophages to the RANKL/MCSF activation, monocytes were seeded on bovine bone slices and differentiated for 14 days in the presence or not of IL-4, with or without RANKL/MCSF (Figure 5). MR expression, measured as positive control of alternative differentiation, was increased by IL-4, independent of RANKL/MCSF treatment (Figure 5A). As already shown in figure 4, RANKL/MCSF treatment induced CTSK mRNA levels in RM but not in M2 macrophages (Figure 5B). Moreover, the number of mature multinucleated TRAP positive osteoclasts was strongly increased by RANKL/MCSF in RM but, not in M2 macrophages (Figure 5C and 5D). The ability of RM and M2 macrophages to degrade bone matrix, evaluated as the number of formed pits and as resorption rate, was significantly enhanced by RANKL/MCSF in RM, but not in M2 macrophages (Figure 5E-5G), indicating that M2 macrophages are unable to degrade bone matrix. Interestingly, the impaired bone resorption phenotype observed in M2 macrophage-derived osteoclasts is identical to those observed in osteoclasts derived from CTSK-KO mice²¹. This suggests that the reduced CTSK expression and activity of M2 macrophages are the driving factors of the impaired bone resorption observed in osteoclasts derived from these cells.

Expression of Blimp1, which regulates CTSK expression, is lower in M2 compared to RM macrophages.

To understand the molecular mechanisms behind the reduced response of M2 macrophages to RANKL/MCSF activation and given the fact that this phenotype is comparable to the one of the CTSK deficient osteoclasts, the levels of known transcriptional regulators of CTSK expression were measured. First, the expression of the two main transcriptional inhibitors of osteoclast differentiation and CTSK expression, namely Bcl6 (B-cell lymphoma 6) and IRF8 (Interferon Regulatory Factor-8)^{43,44} was measured in RM and M2 macrophages. Our results indicate that the expression of both factors was higher in M2 macrophages compared to RM macrophages (Figure 6A and 6B).

Second, analysis of osteoclast activators showed that beside the expression of the master regulator NFATc-1 whose expression is lower in M2 compared to RM macrophages (Figure 1F and 4D), the expression of Blimp1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1), a transcriptional repressor of negative regulators of osteoclastogenesis⁴², was also strongly decreased in M2 compared to RM macrophages (Figure 6C). Moreover, Blimp1 and CTSK mRNA levels in the presence of RANKL/MCSF were lower in M2 compared to RM macrophages at day 2, 4 and 6 of differentiation (Supplemental Figure 5). Together with the lower expression of NFATc-1, these data indicate that the expression of OTC transcriptional activators is inhibited in M2 macrophages compared to RM. To assess the functional role, expression of Blimp1 was siRNA silenced in RANKL/MCSF differentiated RM macrophages (Figure 6D and 6E). Interestingly, reducing Blimp1 expression (Figure 6D) inhibited CTSK expression at the gene (Figure 6E) and protein (Figure 6F) levels, thus recapitulating a M2 macrophage phenotype. These results strongly suggest that the lower Blimp1 expression in M2 macrophages is responsible for the altered CTSK expression in these cells.

Collectively, these observations indicate that the transcriptional program regulating CTSK expression and consequently osteoclast activity is altered in M2 macrophages that are characterized by decreased levels of activators (NFATc-1 and Blimp1) and by concomitantly increased expression of repressors (Bcl6 and IRF8) (Figure 7).

Discussion

The process leading to vascular calcification (VC) in human atherosclerotic lesions, an inappropriate deposition of calcium phosphate mineral, follows an osteochondrogenic pathway resembling the process of bone formation⁴⁵. Growing evidence suggests that VC is an actively regulated process, implicating both inducible and inhibitory factors, mediated by osteoblast-like and osteoclast-like cells, respectively. Furthermore, VC is tightly associated with aging and arterial remodelling, such as intima-media thickening as well as changes in the geometry and function of aortic valves (decreased aortic valve surface area and smaller valve opening). VC is thus an independent risk factor for cardiovascular morbidity and mortality⁴⁶⁻⁴⁸.

Osteoclasts originate from hematopoietic lineage cells derived from bone marrow myeloid precursors or circulating monocytes¹⁰. However, whether mature osteoclasts are present in the arterial wall is still controversial and cells with potential osteoclast properties have been named osteoclast-like cells^{22,49}. Thus, in atherosclerotic lesions, macrophages which express both the MCSF and RANKL receptors⁵⁰ can be activated by their ligands produced by endothelial cells, SMC as well as monocyte/macrophages themselves and can thus potentially differentiate into osteoclast-like cells. Cells positive for TRAP have been observed in human atherosclerotic lesions^{45,51}. CA2 staining co-localizes with the macrophage marker CD68 in human atherosclerotic plaques²⁴. Moreover, CTSK is expressed in macrophages of advanced atherosclerotic plaques²⁵ where it contributes to proteolytic tissue-remodelling and possibly plaque rupture²⁶. Interestingly, we found that macrophages located in areas surrounding intimal calcium deposits in human atherosclerotic lesions display an alternative phenotype, since they express both CD68 and MR^{31,32}. This macrophage sub-population is characterized by lower gene expression levels of CTSK, a phenotype also observed *in vitro* upon IL-4 polarization, accompanied by a reduced protein expression and activity.

These alternative macrophages display a particular phenotype with regard to VC: while they express some of the canonical osteoclast markers, such as CA2, together with high levels of RANK receptor expression, their response to RANKL/MCSF activation is severely altered. Consequently, the M2 alternative macrophages are functionally unable to degrade bone matrix upon RANKL/MCSF activation. Altogether these data indicate that the capacity of bone degradation is impaired in alternative M2 macrophages. Interestingly this phenotype resembles the one observed in osteoclasts derived from CTSK deficient mice²¹, suggesting that the altered CTSK expression and activity observed in M2 macrophages is sufficient to compromise their osteoclast-like activity.

The effects of IL-4 on osteoclast maturation have been studied in other cell models and involve several cellular mechanisms. IL-4 can suppress the development and mature osteoclast functions from mouse bone marrow precursors by suppressing RANK gene expression⁵². This contrasts with the results obtained in human M2 macrophages, characterized by higher RANK expression compared to RM macrophages. This discrepancy can be due to the specie differences (mouse vs human). IL-4 also inhibits osteoclast formation by inhibiting RANKL induction of NFATc1 via a STAT6 dependent pathway⁵³. Furthermore, it is suggested that IL-4 abrogates osteoclastogenesis by inhibiting NF- κ B activation and MAP kinase signalling^{54,55}.

Here we propose a novel transcriptional mechanism by which IL-4 controls osteoclast maturation of alternative macrophages by altering transcriptional machinery regulating osteoclast differentiation. In addition to the reduced expression of NFATc-1, the expression of Blimp1, the other well-known osteoclast activator and repressor of anti-osteoclastogenic genes⁵⁶, is also repressed by IL-4. Moreover, expression of the transcriptional repressors Bcl6 and IRF8 is strongly increased in M2 macrophages compared to RM. By siRNA knock down experiments in RM macrophages we showed that Blimp1 is an essential factor controlling the expression of CTSK. Despite the higher RANK expression in M2 macrophages compared to RM, the response to RANKL/MCSF was blunted, suggesting that the regulation of osteoclast activity takes place down-stream the RANKL/MCSF-RANK interaction.

The fact that M2 macrophages accumulate around calcified areas could be the consequence of their incapacity to resorb pre-existing calcium phosphate crystals, derived, for example, from apoptotic death of SMC which have acquired an osteogenic profile⁵⁷. On the other hand, this calcification might occur spontaneously as a consequence of the impaired osteoclastic activity of resident M2 macrophages surrounding calcium depots. M2 macrophages have now been located in particular areas of the plaque, such as neo-vascularized and haemorrhagic zones^{32,36,58}. Thus, it appears important to

understand the specific signals that induce macrophage accumulation and phenotypic polarization in particular plaque areas, such as those with calcification. However, the very low expression and activity in these M2 macrophages of CTSK, a protease also involved in plaque destabilization^{25,26}, further suggests a role for M2 macrophages in plaque stability.

Despite its clinical relevance, research on the role of macrophages in resorbing mineral deposition in arteries has been limited and remains at an early stage. Since VC rarely regresses, the major goals are prevention of formation and stabilization of existing calcifications. Because intimal calcification relates to atherosclerosis, the general treatment approach is non-specific: lipid lowering therapies, use of aspirin, treatment of obesity and hypertension, physical activity, smoking cessation, and treatment of diabetes. Therefore, approaches to modulate macrophage subpopulations involved in VC may provide future pharmacological approaches targeting these macrophages in order to prevent and/or counteract vascular calcium deposition.

SOURCES OF FUNDING

Grants from the Région Nord-Pas de Calais/FEDER (CPER N. 1449), the Agence Nationale de la Recherche (AIMHA and AIMaVasCal projects), the Fondation de France, the Fondation pour la Recherche Médicale (DPC2011122981), the “European Genomic Institute for Diabetes” (EGID, ANR-10-LABX-46) and European Commission are acknowledged. B. Staels is a member of the Institut Universitaire de France.

DISCLOSURES

None

REFERENCES

1. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*. 2007;116:85-97.
2. Kapustin A, Shanahan CM. Targeting vascular calcification: softening-up a hard target. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9:84-9.
3. Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:2959-64.
4. Speer MY, Giachelli CM. Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol*. 2004;13:63-70.
5. Niederhoffer N, Marque V, Lartaud-Idjouadiene I, Duvivier C, Peslin R, Atkinson J. Vasodilators, aortic elasticity, and ventricular end-systolic stress in nonanesthetized unrestrained rats. *Hypertension*. 1997;30:1169-74.
6. Tsushima M, Terayama Y, Momose A, Funyu T, Ohyama C, Hada R. Carotid intima media thickness and aortic calcification index closely relate to cerebro- and cardiovascular disorders in hemodialysis patients. *Int J Urol*. 2008;15:48-51; discussion 51-2.
7. Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Dunstan CR, Shah PK, Rajavashisth TB. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:11201-6.
8. Yamanouchi D, Takei Y, Komori K. Balanced mineralization in the arterial system: possible role of osteoclastogenesis/osteoblastogenesis in abdominal aortic aneurysm and stenotic disease. *Circ J*. 2012;76:2732-7.
9. Kassem M, Abdallah BM, Saeed H. Osteoblastic cells: differentiation and trans-differentiation. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473:183-7.
10. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:7260-4.
11. Ciancaglini P, Yadav MC, Simao AM, Narisawa S, Pizauro JM, Farquharson C, Hoylaerts MF, Millan JL. Kinetic analysis of substrate utilization by native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-deficient matrix vesicles. *J Bone Miner Res*. 2010;25:716-23.
12. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*. 1999;20:345-57.
13. Cardus A, Panizo S, Parisi E, Fernandez E, Valdivielso JM. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res*. 2007;22:860-6.
14. Thiolloy S, Halpern J, Holt GE, Schwartz HS, Mundy GR, Matrisian LM, Lynch CC. Osteoclast-derived matrix metalloproteinase-7, but not matrix metalloproteinase-9, contributes to tumor-induced osteolysis. *Cancer Res*. 2009;69:6747-55.
15. Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*. 2008;41:218-23.
16. Nakamura I, Duong le T, Rodan SB, Rodan GA. Involvement of alpha(v)beta3 integrins in osteoclast function. *J Bone Miner Metab*. 2007;25:337-44.
17. Riihonen R, Nielsen S, Vaananen HK, Laitala-Leinonen T, Kwon TH. Degradation of hydroxyapatite in vivo and in vitro requires osteoclastic sodium-bicarbonate co-transporter NBCn1. *Matrix Biol*. 2010;29:287-94.
18. Wilson SR, Peters C, Saftig P, Bromme D. Cathepsin K activity-dependent regulation of osteoclast actin ring formation and bone resorption. *J Biol Chem*. 2009;284:2584-92.
19. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289:1504-8.
20. Saijo M, Kitazawa R, Nakajima M, Kurosaka M, Maeda S, Kitazawa S. Heparanase mRNA expression during fracture repair in mice. *Histochem Cell Biol*. 2003;120:493-503.
21. Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:13453-8.
22. Massy ZA, Mentaverri R, Mozar A, Brazier M, Kamel S. The pathophysiology of vascular calcification: are osteoclast-like cells the missing link? *Diabetes Metab*. 2008;34 Suppl 1:S16-20.

23. Qiao JH, Mishra V, Fishbein MC, Sinha SK, Rajavashisth TB. Multinucleated giant cells in atherosclerotic plaques of human carotid arteries: Identification of osteoclast-like cells and their specific proteins in artery wall. *Exp Mol Pathol*. 2015;99:654-62.
24. Oksala N, Levula M, Pelto-Huikko M, Kytomaki L, Soini JT, Salenius J, Kahonen M, Karhunen PJ, Laaksonen R, Parkkila S, Lehtimaki T. Carbonic anhydrases II and XII are up-regulated in osteoclast-like cells in advanced human atherosclerotic plaques-Tampere Vascular Study. *Ann Med*. 2010;42:360-70.
25. Jaffer FA, Kim DE, Quinti L, Tung CH, Aikawa E, Pande AN, Kohler RH, Shi GP, Libby P, Weissleder R. Optical visualization of cathepsin K activity in atherosclerosis with a novel, protease-activatable fluorescence sensor. *Circulation*. 2007;115:2292-8.
26. Lutgens E, Lutgens SP, Faber BC, et al. Disruption of the cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation. *Circulation*. 2006;113:98-107.
27. Mozar A, Louvet L, Godin C, Mentaverri R, Brazier M, Kamel S, Massy ZA. Indoxyl sulphate inhibits osteoclast differentiation and function. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27:2176-81.
28. Van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*. 2006;211:487-501.
29. Chinetti-Gbaguidi G, Colin S, Staels B. Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12:10-7.
30. Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metabolism*. 2007;6:137-143.
31. Chinetti-Gbaguidi G, Baron M, Bouhrel MA, Vanhoutte J, Copin C, Sebti Y, Derudas B, Mayi T, Bories G, Tailleux A, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Staels B. Human Atherosclerotic Plaque Alternative Macrophages Display Low Cholesterol Handling but High Phagocytosis Because of Distinct Activities of the PPAR $\{\gamma\}$ and LXR $\&\alpha$; Pathways. *Circ Res*. 2011;108:985-95.
32. Bories G, Colin S, Vanhoutte J, Derudas B, Copin C, Fanchon M, Daoudi M, Belloy L, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Liver X Receptor (LXR) Activation Stimulates Iron Export in Human Alternative Macrophages. *Circ Res*. 2013;113:1196-1205.
33. Nakamura S, Ishibashi-Ueda H, Niizuma S, Yoshihara F, Horio T, Kawano Y. Coronary calcification in patients with chronic kidney disease and coronary artery disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:1892-900.
34. Chinetti-Gbaguidi G, Bouhrel MA, Copin C, Duhem C, Derudas B, Neve B, Noel B, Eeckhoutte J, Lefebvre P, Seckl JR, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation induces 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in human alternative macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:677-85.
35. Mozar A, Haren N, Chasseraud M, Louvet L, Maziere C, Wattel A, Mentaverri R, Morliere P, Kamel S, Brazier M, Maziere JC, Massy ZA. High extracellular inorganic phosphate concentration inhibits RANK-RANKL signaling in osteoclast-like cells. *J Cell Physiol*. 2008;215:47-54.
36. Finn AV, Nakano M, Polavarapu R, Karmali V, Saeed O, Zhao X, Yazdani S, Otsuka F, Davis T, Habib A, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:166-77.
37. Ernst J, Kheradpour P, Mikkelsen TS, Shores N, Ward LD, Epstein CB, Zhang X, Wang L, Issner R, Coyne M, Ku M, Durham T, Kellis M, Bernstein BE. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*. 2011;473:43-9.
38. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. Induction and activation of the

- transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002;3:889-901.
39. Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, Tanaka S, Inoue J, Reddy SV, Hata K, Yamashita K, Hiraga T, Watanabe T, Kukita T, Yoshioka K, Rao A, Yoneda T. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest*. 2004;114:475-84.
 40. Blumer MJ, Hausott B, Schwarzer C, Hayman AR, Stempel J, Fritsch H. Role of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in long bone development. *Mech Dev*. 2012;129:162-76.
 41. Sorensen MG, Henriksen K, Schaller S, Henriksen DB, Nielsen FC, Dziegiel MH, Karsdal MA. Characterization of osteoclasts derived from CD14⁺ monocytes isolated from peripheral blood. *J Bone Miner Metab*. 2007;25:36-45.
 42. Nishikawa K, Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kato S, Kodama T, Takahashi S, Calame K, Takayanagi H. Blimp1-mediated repression of negative regulators is required for osteoclast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:3117-22.
 43. Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, et al. The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis. *J Exp Med*. 2010;207:751-62.
 44. Zhao B, Takami M, Yamada A, Wang X, Koga T, Hu X, Tamura T, Ozato K, Choi Y, Ivashkiv LB, Takayanagi H, Kamijo R. Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nat Med*. 2009;15:1066-71.
 45. Bostrom KI, Rajamannan NM, Towler DA. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circ Res*. 2011;109:564-77.
 46. Wilson PW, Kauppila LI, O'Donnell CJ, Kiel DP, Hannan M, Polak JM, Cupples LA. Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation*. 2001;103:1529-34.
 47. Massy ZA, Druke TB. Vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013;22:405-12.
 48. Chiu YW, Adler SG, Budoff MJ, Takasu J, Ashai J, Mehrotra R. Coronary artery calcification and mortality in diabetic patients with proteinuria. *Kidney Int*. 2010;77:1107-14.
 49. Doherty TM, Uzui H, Fitzpatrick LA, Tripathi PV, Dunstan CR, Asotra K, Rajavashisth TB. Rationale for the role of osteoclast-like cells in arterial calcification. *Faseb J*. 2002;16:577-82.
 50. Sherr CJ, Rettenmier CW, Sacca R, Roussel MF, Look AT, Stanley ER. The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell*. 1985;41:665-76.
 51. Jeziorska M, McCollum C, Wooley DE. Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *Virchows Arch*. 1998;433:559-65.
 52. Moreno JL, Kaczmarek M, Keegan AD, Tondravi M. IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism: irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. *Blood*. 2003;102:1078-86.
 53. Cheng J, Liu J, Shi Z, Xu D, Luo S, Siegal GP, Feng X, Wei S. Interleukin-4 inhibits RANKL-induced NFATc1 expression via STAT6: a novel mechanism mediating its blockade of osteoclastogenesis. *J Cell Biochem*. 2011;112:3385-92.
 54. Abu-Amer Y. IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF-kappaB. *J Clin Invest*. 2001;107:1375-85.
 55. Wei S, Wang MW, Teitelbaum SL, Ross FP. Interleukin-4 reversibly inhibits osteoclastogenesis via inhibition of NF-kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*. 2002;277:6622-30.
 56. Martins G, Calame K. Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:133-69.
 57. Clarke MC, Littlewood TD, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Bennett MR. Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ Res*. 2008;102:1529-38.
 58. Boyle JJ, Harrington HA, Piper E, Elderfield K, Stark J, Landis RC, Haskard DO. Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *Am J Pathol*. 2009;174:1097-108.

Figure legends

Figure 1. Macrophages surrounding calcified areas of human atherosclerotic lesions are CD68⁺MR⁺ alternative macrophages.

Representative immunostaining for CD68 (red), PECAM-1/CD31 (blue), α -smooth muscle actin (α -SMA, grey) in human atherosclerotic lesions (left). Higher magnification of calcium deposits by Alizarin Red (red), α SMA, CD68 and MR (red) stainings (right). Scale bars are indicated.

Figure 2. Osteoclast markers are differently expressed in RM and M2 macrophages.

q-PCR analysis of MR (A), CA2 (B), CTSK (C), NFATc-1 (F), NFATc-2 (G) and TRAP (H) mRNA levels in primary human M2 macrophages compared to RM, representative of 7 different cell preparations. The mRNA levels were normalized to TFIIB mRNA and expressed relative to the levels in RM set at 1. Protein expression of CTSK (27 KDa) and β -actin (42 KDa) analysed by western blot performed in RM and M2 macrophages from 4 independent donors (D). ns indicates a non specific band. MW: molecular weights. (E) Intracellular CTSK activity was measured in RM and M2 macrophages normalized to cellular protein content. The results are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations relative to the levels in RM set at 1. Statistically differences are indicated (t-test, * p <0.05 and ***<0.001).

Figure 3. RANK expression is higher in M2 macrophages compared to RM macrophages.

(A) q-PCR analysis of RANK mRNA in RM and M2 macrophages. mRNA levels were normalized to TFIIB and results expressed as mean \pm SD of triplicate determinations relative to the levels in RM set at 1, representative of 7 different cell preparations. (B and C) Flow cytometry analysis of RANK expression in RM and M2 macrophages using PE-conjugated anti-RANK monoclonal antibody and APC-MR antibody. Results are representative of 3 independent experiments. (D) Representative immunostaining of MR and RANK in human carotid atherosclerotic lesions. (E) q-PCR analysis of RANK mRNA performed on LCM-isolated CD68⁺MR⁺ and CD68⁺MR⁻ macrophages-rich areas from different atherosclerotic plaques. RANK mRNA levels were normalized to cyclophilin mRNA and expressed relative to the levels in CD68⁺MR⁻ areas set at 1. Each point corresponds to a single atherosclerotic plaque. The mean value is shown. Statistically significant differences are indicated (t-test; * p <0.05 and ***<0.001).

Figure 4. Alternative M2 macrophages are less responsive to RANKL/MCSF activation.

q-PCR analysis RANK (A), CA2 (B), TRAP (C), NFATc-1 (D), NFATc-2 (E), OPN (F) and CTSK (G) mRNA levels measured in RM and M2 macrophages treated or not with RANKL/MCSF during 6 days. mRNA levels were normalized to TFIIB and results expressed as mean \pm SD of triplicate determinations relative to the levels in RM set at 1, representative of 7 donors. (H) Intracellular CTSK activity measured in RM and M2 macrophages cultured in the presence or in the absence of RANKL/MCSF, normalized to cellular protein content. The results are expressed as mean \pm SD from 3 independent donors relative to the levels in RM set at 1. Statistically significant differences are indicated (t-test; * p <0.05, ** <0.01 and ***<0.001).

Figure 5. IL-4 polarized M2 macrophages fail to degrade bone matrix in response to RANKL/MCSF activation.

q-PCR analysis of MR (A) and CTSK (B) mRNA measured in RM and M2 macrophages grown on dentin slices, treated or not with RANKL/MCSF during 14 days. mRNA levels were normalized to TFIIB and results expressed as mean \pm SD of triplicate determinations relative to the levels in RM set at 1, representative of 3 independent donors. (C) TRAP staining (x100 magnification, arrows point multinucleated cells) and quantification of TRAP-positive osteoclasts (OTC) in RM and M2 macrophages treated with RANKL/MCSF (D). Bone slice staining with haematoxylin red and toluidine blue to visualize the resorption lacunae (pits) (x200 magnification, arrows point the pits) (E). The number of pits was counted (F) and the resorption rate calculated and expressed as the "resorbed surface / bone surface" ratio (G). The results represented the mean \pm SD of 3 independent experiments. Statistically significant differences are indicated (t-test; * p <0.05, ** <0.01 and ***<0.001).

Figure 6. Bcl6 and IRF8 are higher expressed in M2 macrophages whereas Blimp1 is higher expressed in RM macrophages and its silencing blocks the expression of CTSK.

q-PCR analysis of Bcl6 (A), IRF8 (B) and Blimp1 (C) mRNA in primary human RM and M2 macrophages, representative of 7 different cell preparations. q-PCR analysis of Blimp1 (D) and CTSK (E) in RANKL/MCSF differentiated RM macrophages transfected with scrambled siRNA or specific Blimp1 siRNA, representative of 3 different cell preparations. The mRNA levels were normalized to TFIIB mRNA and expressed relative to the levels in RM (A, B, C) or to the levels in scrambled transfected cells set at 1 (D, E). (F) Western blot analysis of CTSK and β -actin in scrambled and siBlimp1 transfected RANKL/MCSF differentiated RM macrophages. ns indicates non specific band. Statistically significant differences are indicated (t-test; * <0.05 and ** <0.01).

Figure 7. Transcriptional regulation of osteoclast maturation in RM and M2 macrophages.

Activation of NFATc-1 by RANKL/MCSF leads to an increased expression of Blimp1, a repressor of the Bcl6 and IRF8 inhibitors, thus leading to the generation of functional RM-derived osteoclasts via increased expression of CTSK. M2 macrophages are characterized by lower expression of NFATc-1 and Blimp1 and increased expression of both Bcl6 and IRF8, thus leading to repressed CTSK expression generating non functional derived osteoclasts.

Legend of supplemental figures

Supplemental Figure 1. H3K9ac ChIP-sequencing data for RM and M2 macrophages.

Normalized H3K9ac levels at the CTSK (A) and CA2 (B) promoters in RM and M2 macrophages obtained from 2 independent donors.

Supplemental Figure 2. Expression of CTSK in alternative macrophages *in vivo*.

q-PCR analysis of CTSK mRNA performed on LCM-isolated CD68⁺MR⁺ and CD68⁺MR⁻ macrophage-rich areas from atherosclerotic plaques. CTSK mRNA levels were normalized to cyclophilin mRNA and expressed relative to the levels in CD68⁺MR⁻ areas set at 1. Each point corresponds to a single atherosclerotic plaque. The mean value and statically significant differences are indicated (t-test; *** p< 0.001).

Supplemental Figure 3. Expression of CA2 protein in alternative macrophages.

Protein expression of CA2 analysed by flow cytometry and western blot performed in RM and M2 macrophages from 3 independent donors (A). Representative immunostaining for MR and CA2 in human atherosclerotic lesions (B). Scale bar is indicated.

Supplemental Figure 4. Osteoclast markers are differently expressed in M2 macrophages.

mRNA levels of CLU (A), NBCn1 (B), MMP-9 (C), HSPE-1 (D) and OPN (E) were measured by QCR in primary human M2 macrophages compared to RM macrophages. The mRNA levels were normalized to TFIIB mRNA and expressed relative to the levels in RM set at 1, representative of 7 healthy donors. Statistically significant differences are indicated (t-test, **<0.01 and ***<0.001).

Supplemental figure 5. Expression of Blimp1 and CTSK during osteoclast differentiation of RM and M2 macrophages.

Q-PCR analysis of Blimp-1 (A) and CTSK (B) in RM and M2 macrophages differentiated in the absence or in the presence of MCSF/RANKL for the indicated time periods (2, 4 and 6 days). The mRNA levels were normalized to TFIIB mRNA and expressed relative to the levels in RM at day 2 set at 1. Statistically significant differences are indicated (t-test, *<0.05, **<0.01 and ***<0.001, RM vs RM+MCSF/RANKL and RM+MCSF/RANKL vs M2+MCSF/RANKL; \$\$<0.01 and \$\$\$<0.001, RM vs M2).

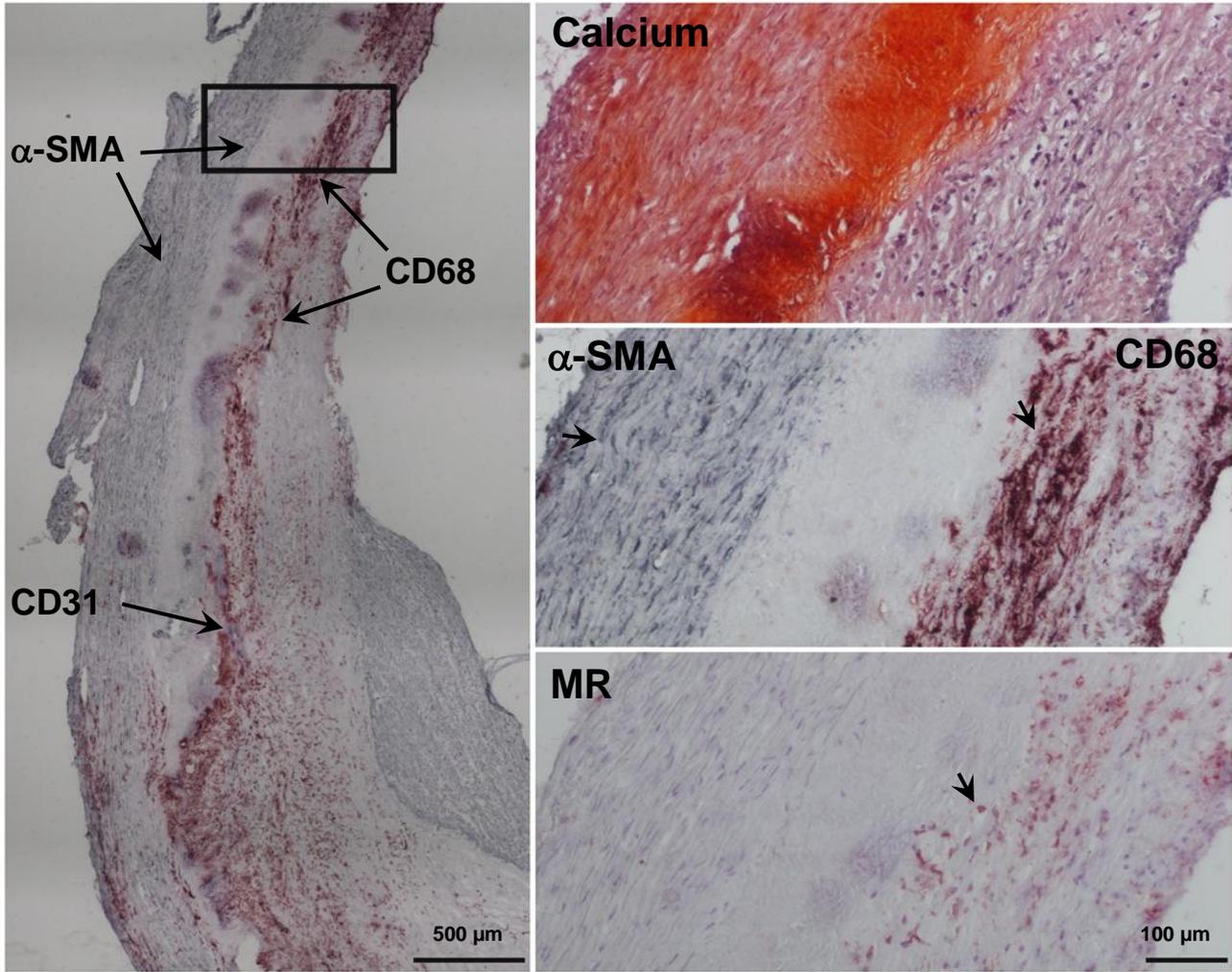


Figure 1

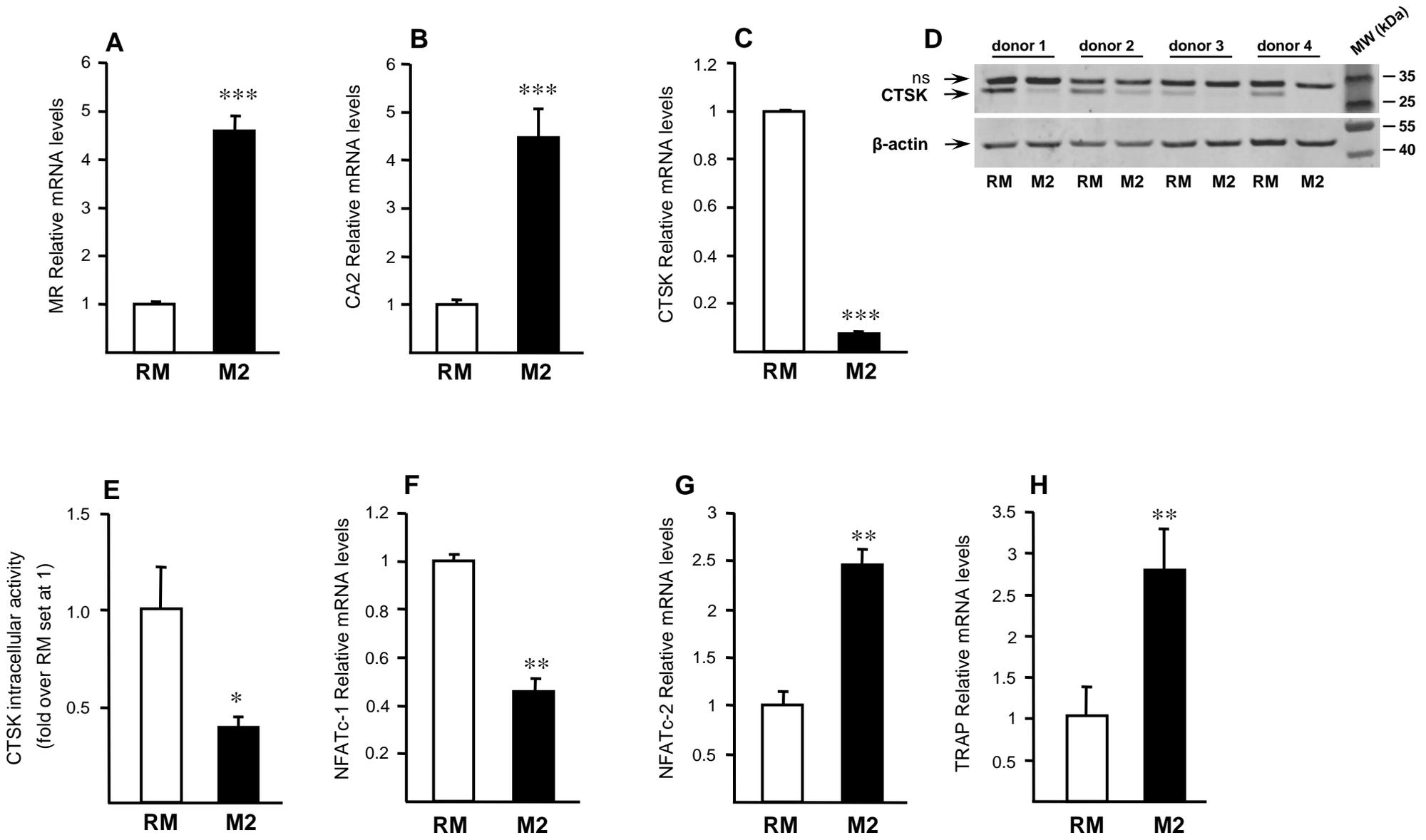


Figure 2

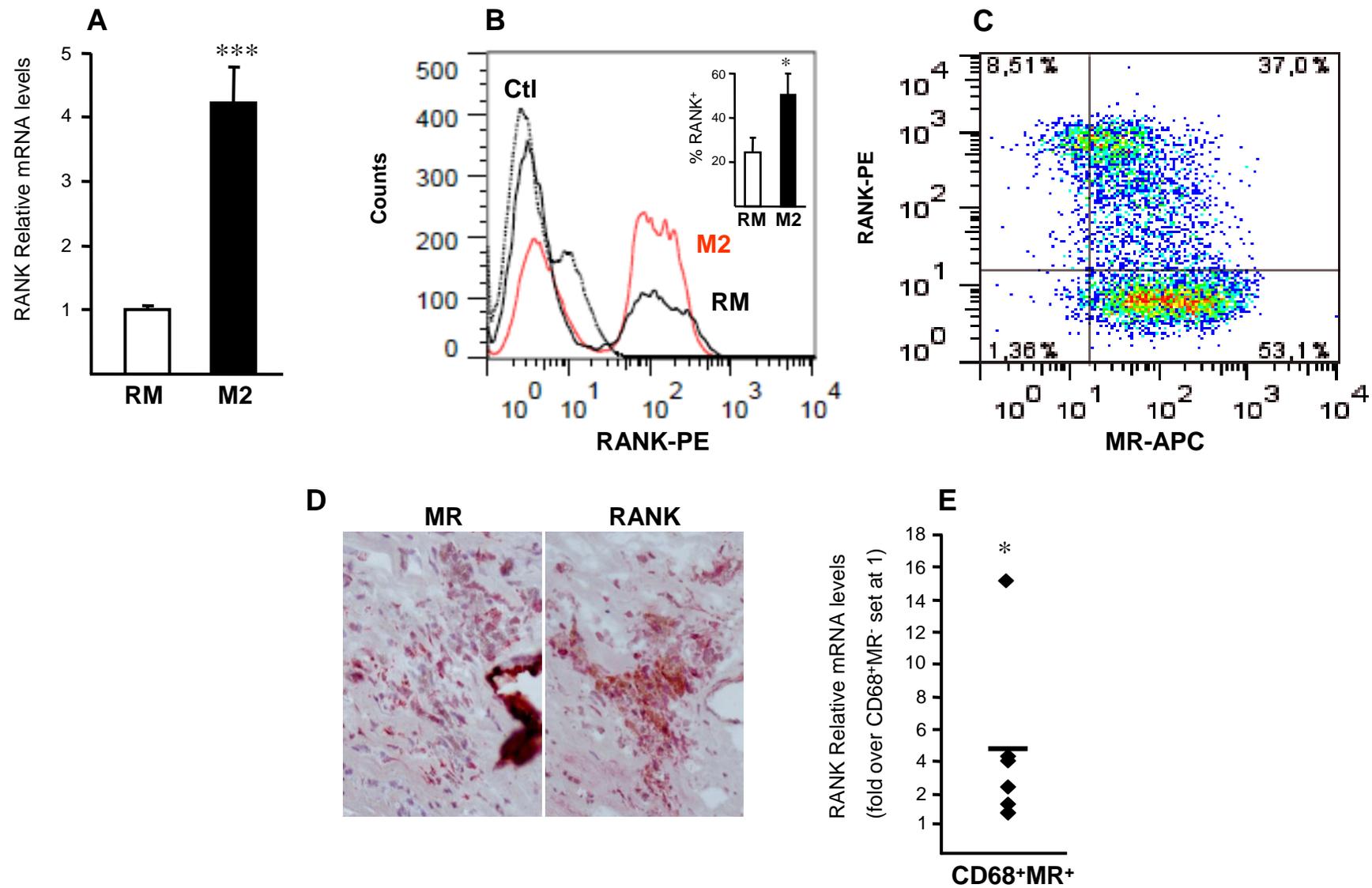


Figure 3

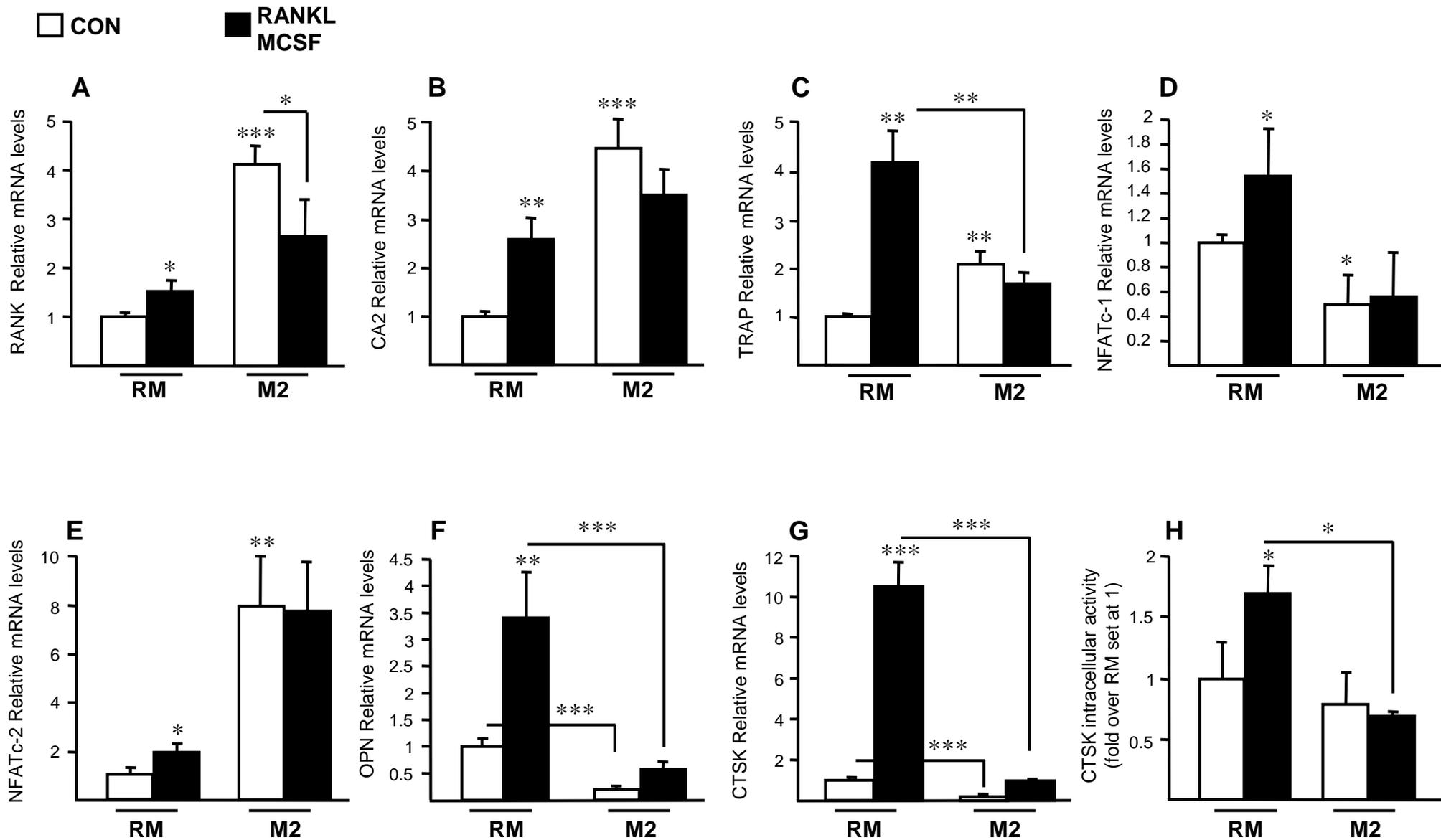


Figure 4

CON
 RANKL
 MCSF

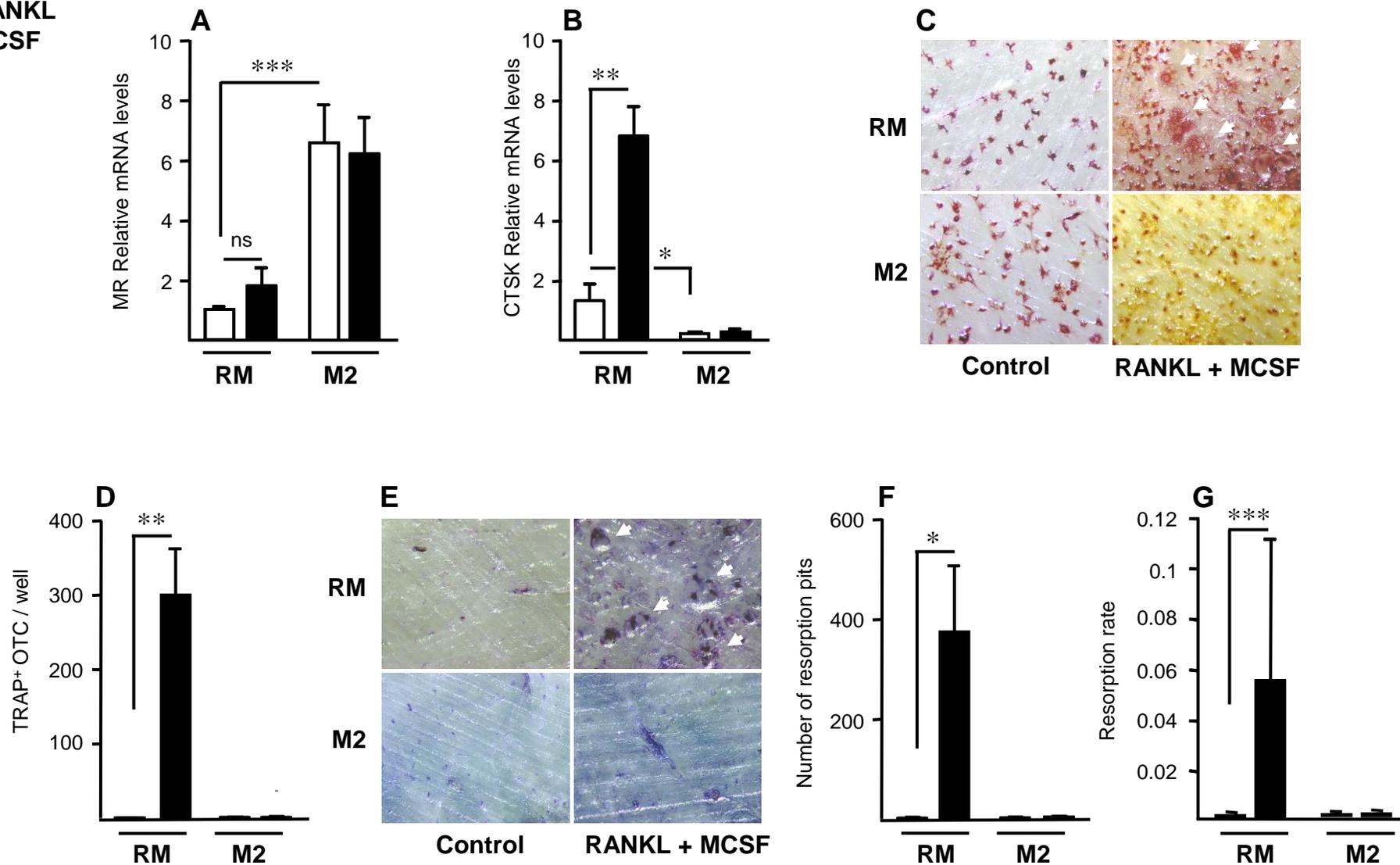


Figure 5

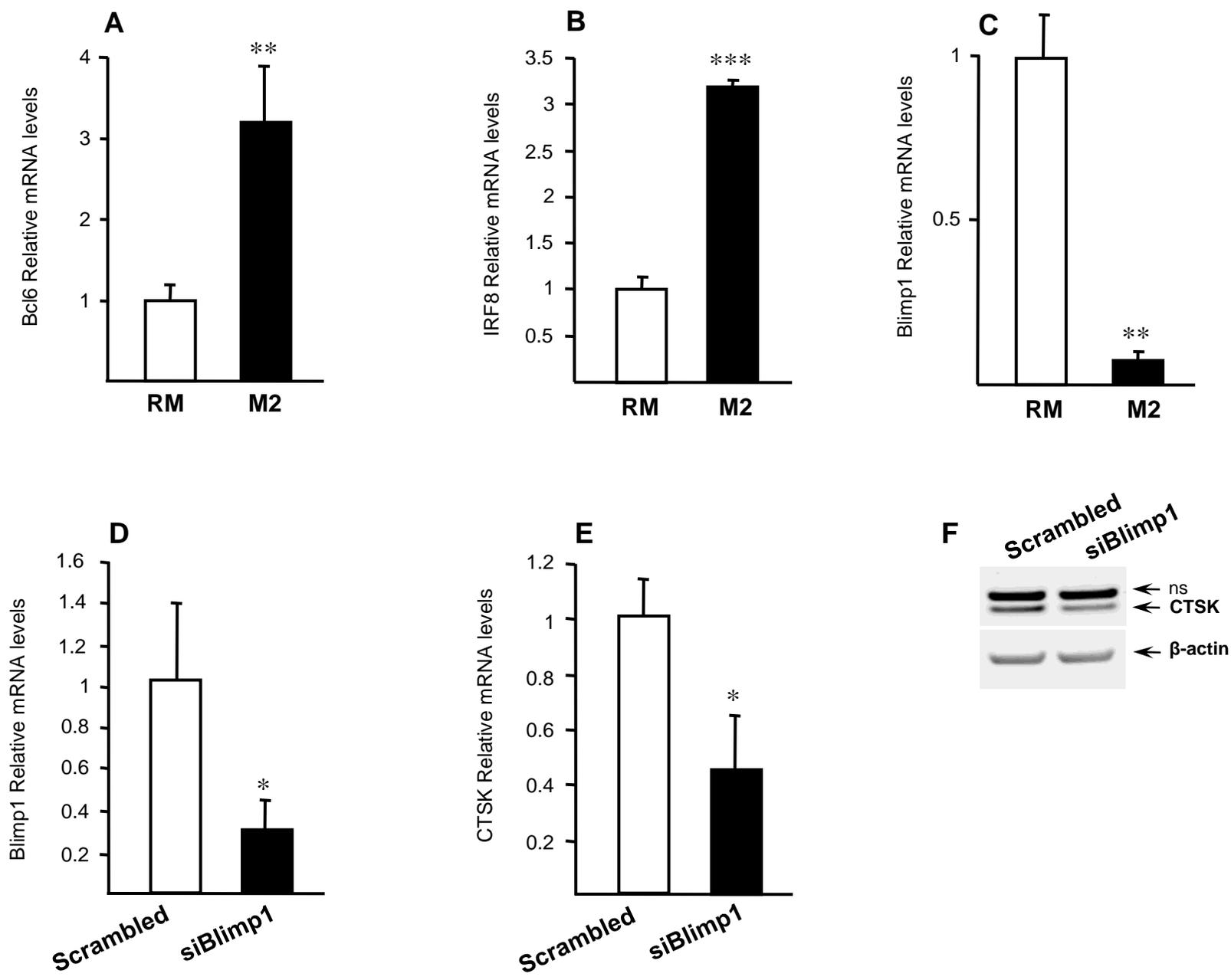
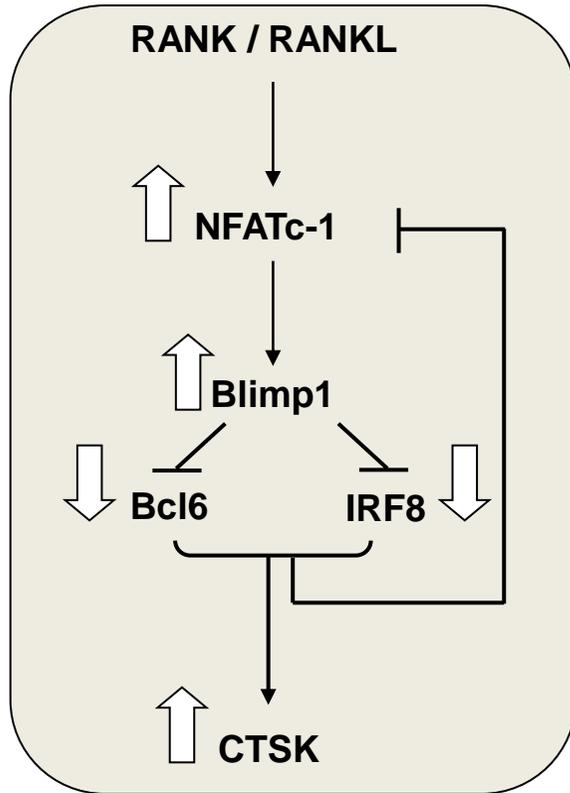


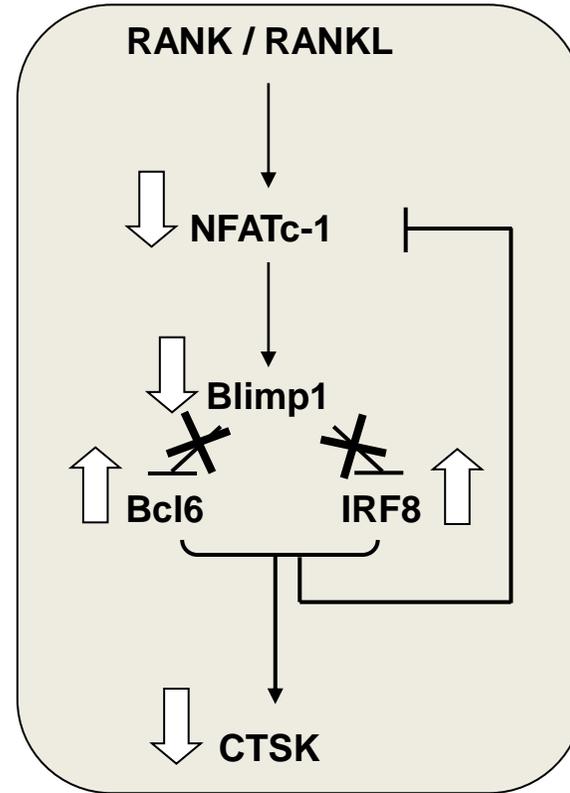
Figure 6

RM Macrophages

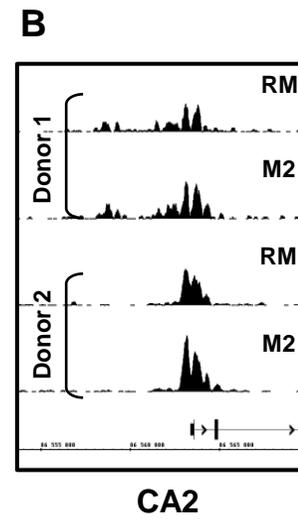
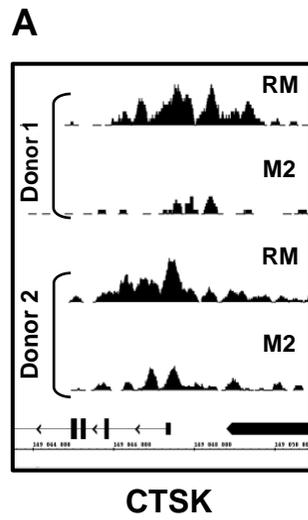


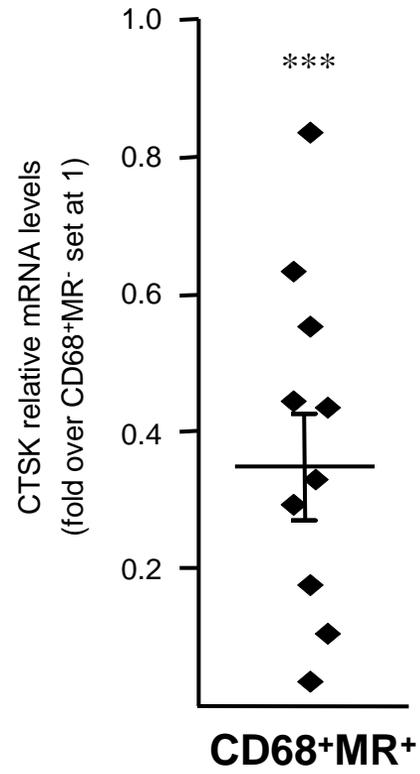
Functional OTC-like cells

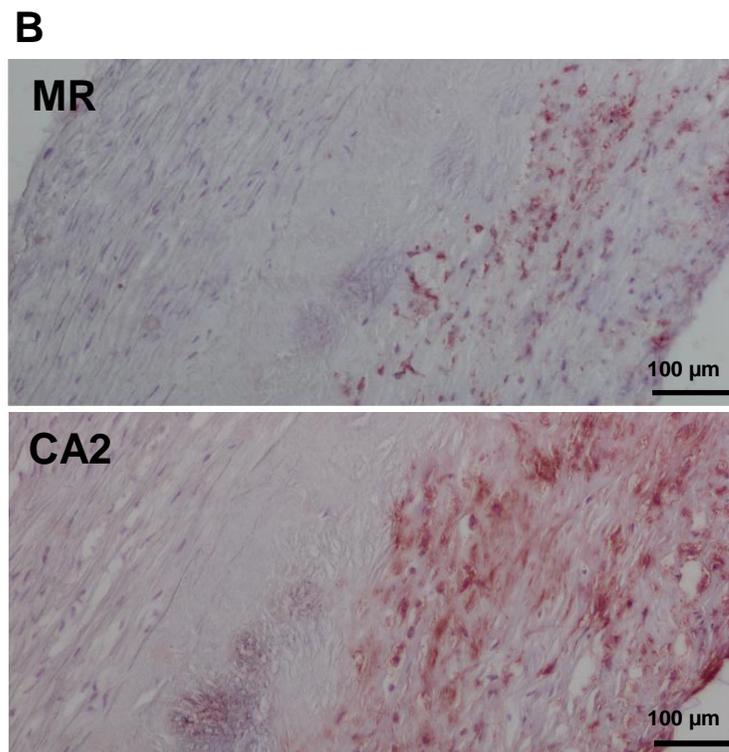
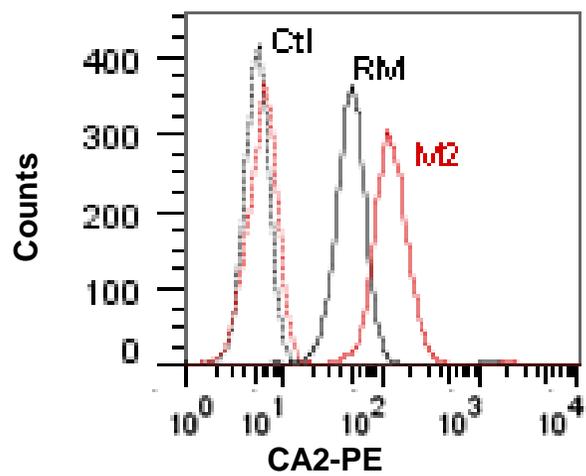
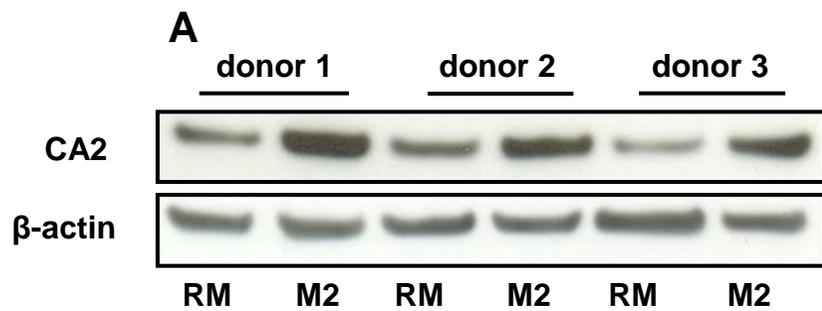
M2 Macrophages

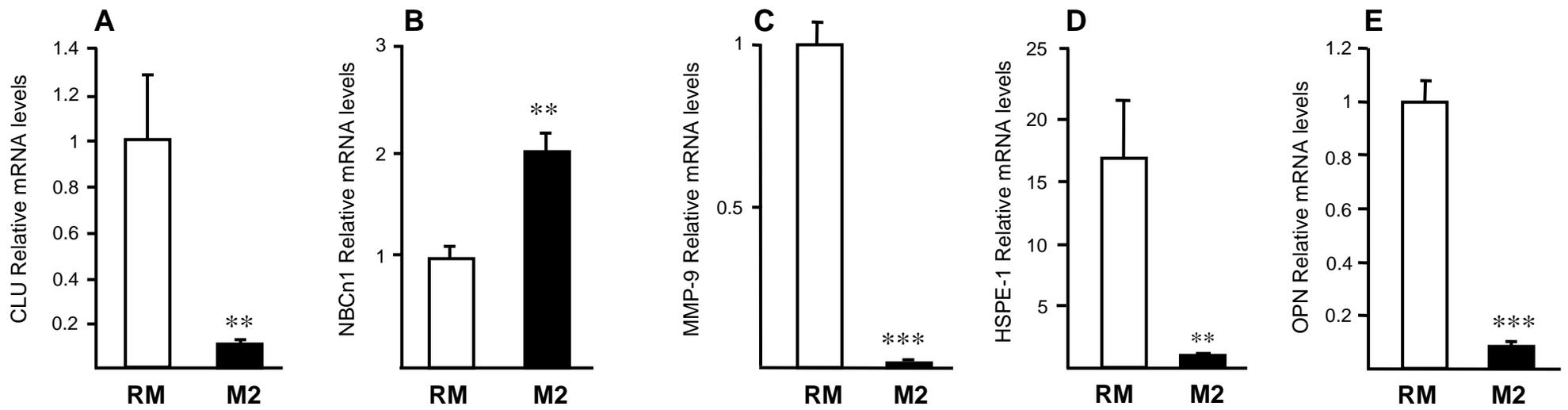


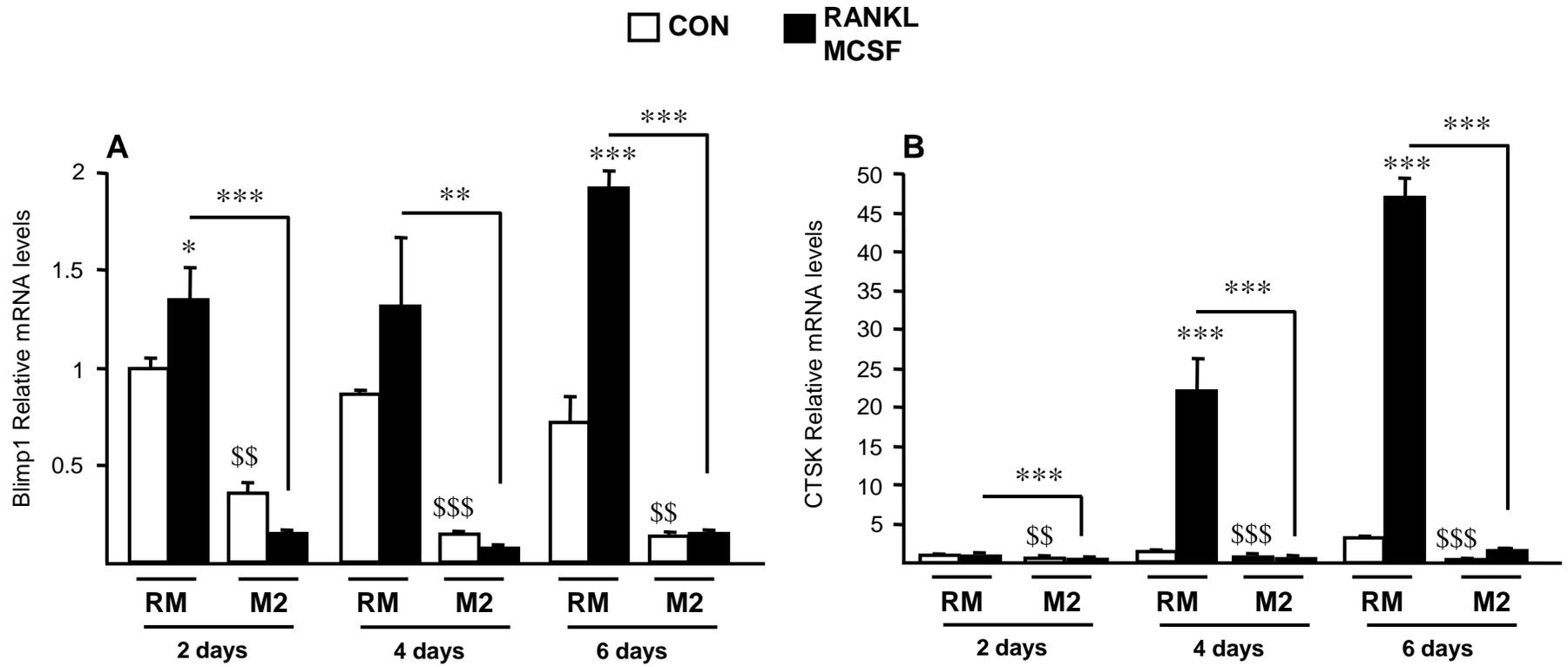
Non functional OTC-like cells











Gene name		sequence (5' to 3')
Mannose Receptor (MR)	Forward	GCA ATC CCG GTT CTC ATC GC
	Reverse	CGA GGA AGA GGT TCG GTT CAC C
Cathepsin K (CTSK)	Forward	CCC CTG TCT CAT TCC CGC
	Reverse	CAG GGC ACC CAC AGA GCT AA
Carbonic anhydrase II (CA2)	Forward	CTT CCC TGA AGC CCC TGT C
	Reverse	GTA AGT GCC ATC CAG GGG TC
RANK	Forward	TGC CTT GCA GGC TAC TTC TCT G
	Reverse	TGC AAA CCG CAT CGG ATT TCT CTG
TRAF5	Forward	CAC TGC ATC CTG TCC CTG AG
	Reverse	GAA GGT GAT CCT GGT ACC GG
NFATc-1	Forward	GTG CAA GCC GAA TTC TCT GGT G
	Reverse	ACT GGC TTC GCT TTC TCT TCC C
Bcl6	Forward	CAG CCA CAA GAC CGT CCA TAC C
	Reverse	CGC AGG TTT CGC ATT TGT AGG G
Blimp-1	Forward	CTG AAG GTC CAC CTG AGA GTG C
	Reverse	TGG CTT TTC TCC CGT GTG TAC C
IRF8	Forward	CTG TCG GAG TCA GCT CCT TC
	Reverse	CTG ATC ACC ATC TGG GAG AAT G

Gene name		sequence (5' to 3')
NFATc-2	Forward	AGA AGA CCA CAG ATG GAC AG
	Reverse	GAC TGG GTG GTA GGT AAA GTG
Osteopontin (OPN)	Forward	AGG CTG ATT CTG GAA GTT CTG AGG
	Reverse	ACT CCT CGC TTT CCA TGT GTG AGG
TRAP/ACP5	Forward	CAG ACT TCA TCC TGT CTC TAG G
	Reverse	ATA CGT CCT CAA AGG TCT CC
MMP-9	Forward	CCT CGA AGA TGA AGG GGA AG
	Reverse	GAC GAT GAC GAG TTG TGG TC
NBCn1	Forward	ACA GCG GGT TAC AGG GCT AA
	Reverse	TGC TTA GCA GGC ATT CCA AA
HSPE-1	Forward	GAC GGC TAA GAT GCT GAA GAG C
	Reverse	CTT GGT AGC AGT CCG TCC ATT C
Clusterin (CLU)	Forward	GAG ATC TTG TCT GTG GAC TG
	Reverse	GAC TTT AGC AGC TCG TTG TA
TFIIB	Forward	ACC AGC CGT TTG GAT GCT C
	Reverse	CCC ACA TCA ATA ACC CGG TC
Cyclophilin	Forward	GCA TAC GGG TCC TGG CAT CTT GTC C
	Reverse	ATG GTG ATC TTC TTG CTG GTC TTG C